Aus dem Institut für Anthropologie und Humangenetik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. et phil. W. Gieseler

Entwicklung und Bedeutung der klinischen Zytogenetik mit besonderer Berücksichtigung methodischer Fragen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Susanne Mayer-List
aus Stuttgart

1969

Aus dem Institut für Anthropologie und Humangenetik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. et phil. W. Gieseler

Entwicklung und Bedeutung der klinischen Zytogenetik mit besonderer Berücksichtigung methodischer Fragen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Susanne Mayer-List
aus Stuttgart

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

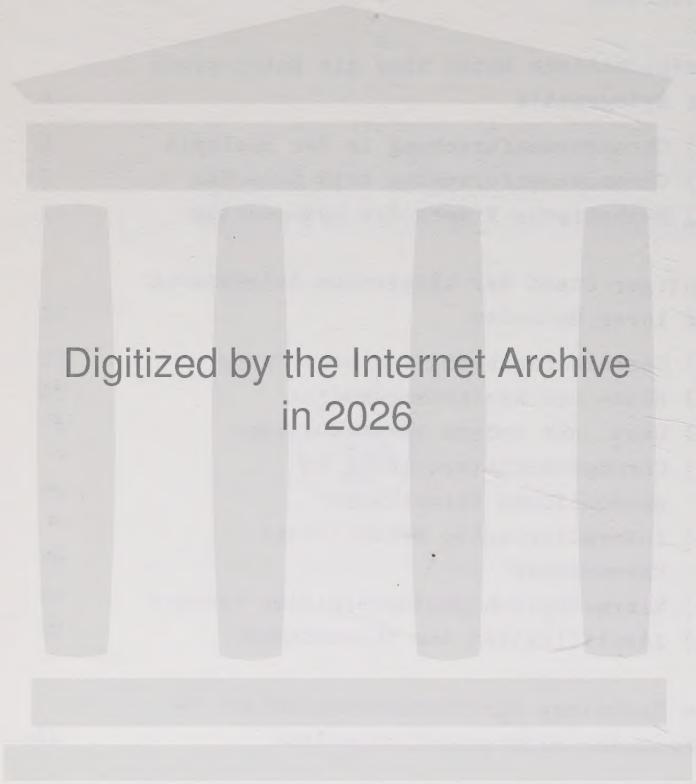
Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Haberlandt

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. W. Gieseler

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	Einleitung	1
II	Geschichtliche Daten über die Entwicklung der Zytogenetik	4
	1.) Chromosomenforschung in der Biologie	6
	2.) Chromosomenforschung beim Menschen	9
	3.) Methodische Fragen der Zytogenetik	14
III	Heutiger Stand der klinischen Zytogenetik und ihrer Methoden	20
	1.) Geschlechtschromatinuntersuchung	22
	2.) Blut- und Knochenmarkkultur	30
	3.) Haut- und andere Gewebekulturen	41
	4.) Chromosomenuntersuchung an menschlichen Keimzellen	47
	5.) Autoradiographie menschlicher Chromosomen	51
	6.) Mikroskopisch-photographische Technik	57
	7.) Identifikation der Chromosomen	58
IV	Die Bedeutung der Chromosomenanalyse im Rahmen der klinischen Diagnostik	62
V	Zusammenfassung	69
VI	Literatur	71



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0117

I EINLEITUNG

Noch vor gar nicht allzu langer Zeit, in der Mitte der fünfziger Jahre, führte dieser Forschungszweig der Zytogenetik fast ein Schattendasein am Rande der medizinischen bzw. biologischen Grundlagenforschung. Nachdem BARR (1949) und DAVIDSON (1954) eine einfache Methode zur Geschlechtsdifferenzierung an Gewebs- und Blutzellen entdeckt hatten, schien die Epoche der Pioniere abgeschlossen zu sein. Die Forschungsmöglichkeiten schienen mit den zur Verfügung stehenden Mitteln erschöpft, die Tatsachen hinlänglich bekannt. In allen Lehrbüchern hatte sich die Zahl 48 für die menschlichen Chromosomen längst eingebürgert.

Da erscheint 1956 der sensationelle Artikel von TJIO und LEVAN, in dem sie über Primärkulturen menschlicher Lungenfibroblasten von vier Embryonen berichten. Die Chromosomenzahl sei eindeutig 46. Beobachtungen aus demselben Jahr von HANSEN-MELANDER, MELANDER und KULLANDER an fetalen Leberzellen, die aus Furcht vor einem Irrtum nicht veröffentlicht wurden, bestätigen das Ergebnis. Zur Sicherung empfehlen TJIO und LEVAN, Untersuchungen an Testisgewebe zu machen, da ihrer Meinung nach während der embryonalen Entwicklung oder während der Kultur eventuell Chromosomen verloren gehen können.

FORD und HAMERTON zerreißen die Tubuli zur Betrachtung und erhalten so isolierte Spermatozyten. Sie entgehen damit der Gefahr, durch Paraffineinbettung und Schnitte Chromosomen oder Chromosomenbruchstücke zu verlieren, und rechtfertigen mit ihrem Ergebnis die neue Methode des hypotonischen Schocks von TJIO und LEVAN. Nur KODANI (1957) besteht bei den Japanern auf zwei Typen, einen mit 46 und einen mit 48 Chromosomen.

Zur Erklärung bisheriger Fehlerquellen und fast zur Entschuldigung früherer Autoren schreibt FERGUSON-SMITH (1960):"Die frühen Beobachtungen an menschlichen Chromosomen

wurden meistens an Schnitten von Testisgewebe gemacht, das nach den histologischen Routinemethoden fixiert und gefärbt wurde. Die Menge dieses Materials war so beschränkt, daß es bemerkenswert ist, wie nahe diese frühen Arbeiten der korrekten Antwort kamen."

Im Gegensatz dazu meint EBERLE (1966):"Sieht man von der Entdeckung des XY-Geschlechtsdeterminismus ab ..., dann hat die Humanzytogenetik bis 1940 nicht wesentlich mehr erbracht, als bereits FLEMMING 1882 entdeckt und publiziert hat."

Doch als Tatsache bleibt, daß die präparative Technik, die verwendet wurde, kaum zu anderen Ergebnissen führen konnte Ihre Verbesserung war nötig, nicht die des Mikroskops. Die Metaphasechromosomen waren so zusammengedrängt, daß das Zählen große Schwierigkeiten bereitete und unwillkürlich zu subjektiven Interpretationen führte. Weitere irrtümliche Ergebnisse ergaben sich auf Grund vielerlei Ursachen. Eine bestand in der frühzeitigen Disjunction des XY-Bivalents in der ersten Metaphase der Spermatozyten, andere darin, daß die kleine terminale Schlinge eines großen Bivalents mit verschiedenen Chiasmata für ein zusätzliches kleines Bivalent gehalten wurde, die beiden Chromatiden eines großen Chromosoms für zwei sich überlappende Chromosomen oder jeder Arm eines großen Chromosoms mit verlängerter Zentralregion für ein getrenntes Chromosom.

Mit jedem nun folgenden Jahr wurden neue, fast unglaubliche Entdeckungen veröffentlicht. Erst damals entstand eigentlich die Zytogenetik, die die genetischen Probleme untersucht, die auf der Korrelation zwischen erblichem Verhalten und zytologischen, besonders chromosomalen Verhältnissen beruht. Immer neue Krankheitsbilder konnten auf Chromosomenanomalien zurückgeführt werden. Die Ursache für Mongolismus (LEJEUNE, GAUTIER und TURPIN, 1959), für Klinefelter- (JACOBS und STRONG, 1959) und Turner-Syndrom (FORD, JONES et al., 1959), um nur die bekanntesten zu nennen, wurde geklärt.

Und heute hat dieser Zweig der medizinischen Grundlagenforschung so an Bedeutung gewonnen, daß manche Ärzte für die Chromosomenuntersuchung in Zukunft die zentrale Stellung sehen, die augenblicklich das Blutbild einnimmt.

II GESCHICHTLICHE DATEN ÜBER DIE ENTWICKLUNG DER ZYTOGENETIK

Das Geburtsjahr der Zytogenetik findet man erstaunlich früh, nämlich 1831, als ROBERT BROWN den Zellkern entdeckt. 1833 schreibt er:"Die wenigen Hinweise auf das Vorhandensein dieses Nucleus (oder Areole), auf die ich bis jetzt in den Veröffentlichungen der Botaniker gestoßen bin, finden sich vornehmlich in einigen Zeichnungen der Epidermis ... Aber so geringe Bedeutung scheint man ihm zuzuerkennen, daß er in den Erläuterungen der Figuren, in denen er dargestellt ist, nicht immer erwähnt wird."

Lange Zeit geriet diese Beobachtung in Vergessenheit. selbst MENDELs Gesetze 1865 konnten sie nicht zu neuem Leben erwecken.

Erst ARNOLD (1879) kann die Entwicklung der Zytologie fortsetzen, indem er Kernteilungen in den Zellen der Geschwülste findet. Als erster beschreibt er, "daß in den Zellen der meisten Geschwülste eine fadige Struktur der Kerne nachweisbar ist ... Ihre Anordnung hatte sich bald als eine mehr gerüst- oder geflechtartige, bald als eine mehr radiäre ergeben."

Schon 1880 veröffentlicht FLEMMING detailiertere Beobachtungen, nämlich, "daß dieselben (die Kernfäden) sich von jenen andern feinen Kernfasern durch jene eben erwähnte Eigenschaft durchweg unterscheiden: die ersteren sind stark tingierbar, die letzteren nicht." Weiter liest man:"Ich finde, daß diese Fäden überall, wo ich sie überhaupt deutlich darstellen kann, eben denselben Unterschied gegen die Kernfäden zeigen wie jene blassen Fasern der Kernspindel: sie sind tingierbar. Und es scheint mir... , daß diese Fäden von vornherein im Inneren der Äquatorialplatte und Kerntonne angelegt sind." Damit hatten die Kernfäden schon ihren heutigen Namen Chromosomen bekommen, d.h. sie waren anfärbbar. Sogar die Längsspaltung der Chromosomen wurde bereits erkannt. Dafür spricht der Umstand, "daß bei den genannten Zellarten die

Fädenstücke der Äquatorialplatte, der Kerntonne und der Anfangsphase der Tochterkerne von halber Dicke und von doppelter Zahl gefunden werden wie am dickstrahligen Mutterstern." Allerdings waren die Forschungsobjekte von FLEMMING (Amphibien und Allium) wohl auch günstiger und weniger problematisch als das menschliche Untersuchungsmaterial.

In den folgenden Jahren trennen sich nun die beiden Forschungsgebiete mehr und mehr. Aus diesem Grund soll ihre weitere Entwicklung getrennt verfolgt werden.

1.) Chromosomenforschung in der Biologie

In demselben Jahr (1880), in dem FLEMMING Einzelheiten des Kernaufbaus beschreibt, erkennt BARANETZKY eine innere Spiralstruktur in den Metaphasechromosomen von Tradescantia.

1882 kannFLEMMING durch die Verbesserungen der Versuchsbedingungen, d.h. durch Verwendung von Ölimmersion und guter Beleuchtung von neuen Forschungsergebnissen berichten:"Hier (bei Salamandra und Triton) läßt sich erstens sehen, ... , daß im Äquator keine Kontinuitätstrennung von Fäden ihrer Quere nach stattfindet, sondern daß die Fädenmasse schon vor der Trennung,in der Sternform, in Schleifen von gleicher Länge segmentiert ist, welche sich in der Äquatorialplatte nur zu zwei Hälften umordnen."

1907 berichte GUTHERZ von sogenannten Heterochromosomen: "Unsere Kenntnis der Heterochromosomen datiert seit der merkwürdigen Beobachtung HENKINGs (1891) von Pyrrhocoris apterus bei der zweiten Reifungsteilung, wo ein Chromosom ungeteilt in die eine Tochterzelle übergeht. ... so hat man sie (die Heterochromosomen) mit dem vielfach und doch meist vergeblich bearbeiteten Problem der sexuellen Differenzierung in Verbindung gebracht." GUTHERZ beschreibt drei Hauptphänomene in der Abweichung:

1. Heteropyknose: bezüglich des Konzentrationsgrads der chromatischen Substanz;
2. Heterosyndese: abweichendes Verhalten bei Chromosomenpaarung;
3. Heterokinese: die Erscheinung, daß ein Chromosom ungeteilt dem einen Pol zuwandert.

1911 gibt WILSON einen ausführlichen Bericht über dieses Problem. 1905/06 betrieb er Studien mit Hemiptera und Coleoptera. Er findet zwei Typen, das weibliche Geschlecht sei in jedem Fall homogametisch, beim männlichen entdeckt er bei einem Typ zusätzlich zum X-Chromosom ein sog. "small idio-

chromosome", das er später (1909) Y-Chromosom nennt. Beim zweiten Typ hält er das Y-Chromosom in manchen Zellen für so klein, daß es nicht sichtbar sei. In allen Fällen sei aber das männliche Geschlecht als digametisch anzunehmen. Zu dem Problem der Geschlechtsdetermination schreibt er, daß er sie nicht ausschließlich in den Geschlechtschromosomen sieht, daß er sie aber als ein - wahrscheinlich sogar wesentliches - Glied in der Kette der Faktoren betrachtet, durch die das Geschlecht bestimmt und vererbt wird. Die Schlußfolgerung aus längeren Erörterungen ergibt, daß aus der Vereinigung zweier aktiver Chromosomen ein weibliches Wesen entsteht, während aus einem aktiven und einem weniger aktiven Chromosom (eventuell sogar ohne das letztere) ein männliches Wesen entsteht. Unter Umständen hält er das auch für eine Basis, die geschlechtsgebundene Vererbung zu verstehen, und führt als Beispiel die Farbenblindheit an.

1914 gelingt es BRIDGES seine in der Bedeutung um Jahrzehnte vorausgreifende Hypothese zu bestätigen. Er nimmt an, daß bei einer Störung der Reduktionsteilung in der Meiose zwei univalente X-Chromosomen sich nicht trennen. Bei der Befruchtung können also folgende Kombinationen entstehen: XXY, XO, XXX und YO. Außer einer Fliege mit Y2A, die vermutlich nicht lebensfähig ist, fand er alle drei anderen Typen.

1916 geht BRIDGES nochmal näher auf das Problem der "Chromosomentheorie der Vererbung" ein, führt die Non-Disjunction als Ursache für das Erscheinen von Mosaiken und überzähligen Chromosomen an und beweist diese geniale Erkenntnis durch geschlechtsgebundene Gene. Auch das Geschlecht selbst sei nicht im Ei oder in der Spermie bestimmt, sondern mit dem Augenblick der Befruchtung. Der Zusammenhang zwischen den MENDEL'schen Gesetzen und der Chromosomenverteilung in der Meiose ist somit hergestellt.

Der von FLEMMING 1880 erstmals gegebene Begriff des Chromatins bei bestimmten Gerüstsubstanzen des gefärbten Zellkerns wird von HEITZ (1929) nach umfangreichen Studien bei

Pflanzen und Tieren in Hetero- und Euchromatin differenziert (cit. nach EBERLE, 1966). "Unterschiede dieser Art finden sich bei Tieren in erster Linie zwischen Autosomen und Geschlechtschromosomen ... Man könnte vielleicht noch besser von labilem und stabilem Chromatin sprechen oder, um eine später zu erörternde Theorie der Genwirkung anzudeuten, von aktivem und passivem Chromatin." "Wir stehen also vor der paradoxen Tatsache, daß die Kernteilung bei den meisten Dikotylen gar nicht nach dem herkömmlichen Schema verläuft (gleichmäßige Rückbildung der Chromosomen in der Telophase unter scheinbarem Verlust ihrer Individualität), sondern zumindestens größe Chromosomenstücke, wenn nicht ganze Chromosomen ... in der Telophase als solche erhalten bleiben."

KEMP (1930) bemüht sich, die Konstanz der Chromosomenzahl zu sichern. Die Schwierigkeit besteht darin, Material zu finden, das ohne Einbettung und Zerlegung in Schnitte untersucht werden kann. Aber schließlich geht aus den Untersuchungen sowie aus der Literatur hervor, "daß die Chromosomenzahl in den somatischen Zellen normaler Gewebe bei Menschen und warmblütigen Tieren in der Regel konstant ist und der in den Keimzellen enthaltenen diploiden Zahl entspricht."

Die Entwicklung schreitet schnellvorwärts, vor allem durch Verwendung der Riesenchromosomen (aus Speicheldrüsen von Dipteren-Larven), deren Bedeutung und Eignung für genetische, systematische und histochemische Studien erst jetzt erkannt wird (HEITZ und BAUER, 1933; PAINTER, 1934). Weitere Entdeckungen auf diesem Gebiet sind:

1931 die Beschreibung des Crossing-over (STERN);

1933 die lineare Anordnung der Gene und die Zuordnung bestimmter Mendelfaktoren zu bestimmten Strukturelementen (PAINTER);

1941 der Vorstoß in das Gebiet der Chemie und Physiologie des Zellkerns und der Chromosomen (CASPERSSON);

1952 Translokationen und Pachytän-Chromosomenkarten bei der Maus (SLIZYNSKI).

2.) Chromosomenforschung beim Menschen

Trotz größerer Schwierigkeiten bei der Gewinnung geeigneten Materials macht auch dieses Gebiet zu Beginn erstaunliche Fortschritte.

Schon 1882 demonstriert FLEMMING Mitosen aus den Epithelzellen einer Cornea und aus dem Blut eines "Leukozythämischen".

HANSEMANN berichtet 1891 über pathologische Mitosen. Er hält eine asymmetrische Mitose charakteristisch für die Karzinomzelle. Außerdem findet er zahlreiche hyperchromatische Zellen bei jeder pathologischen Wucherung. Seine Beobachtung hinsichtlich der Chromosomenzahl in drei Zellen menschlichen Gewebes schwanken zwischen 18, 24 und 40 Chromosomen. FLEMMING entscheidet sich trotz vieler Gegenstimmen für 24 Doppelchromosomen. HANSEMANN ist letzten Endes für eine Zahl, die sicher höher als 24 sein müsse. Auf der anderen Seite steht BARDELEBEN, der sich für eine geringere Zahl (16 oder 8) ausspricht und alles andere für abnorme, pathologische Hyperchromatosen hält. FLEMMING verteidigt sich, so gut das mit den damaligen Kenntnissen möglich war.

WILCOX (1900) steuert zu der allgemeinen Verwirrung die Zahl 18 bei, die er bei sofort fixiertem Testisgewebe fand.

DUESBERG (1906) spricht sich ebenfalls für höchstens 24 Chromosomen bei Spermatogonien und bei somatischem Gewebe aus, für 12 bei Spermatozyten.

VON WINIWARTER gibt 1912 einen umfassenden Bericht über seine Studien bei der menschlichen Spermatogenese. Ebenso wie vor ihm schon DUESBERG betont er, daß die Schnittdicke keinesfalls geringer als 5-12μ sein dürfe, um ganze, unverletzte Zellen für die Betrachtung zu erhalten. Er beschreibt, daß man die Chromosomen am leichtesten zählen könne, wenn die Kernmembran sich aufgelöst hat un die Chromosomen sich im Protoplasma verteilen. In der Länge der Chromosomen erkennt er bemerkenswerte Unterschiede und sieht, daß sie der

Länge nach in zwei parallele Filamente geteilt sind, die sich niemals merklich voneinander trennen.

Er zählt 32 Zellen, davon fand er 29mal 47 Chromosomen, in zwei Zellen 46 Chromosomen, in einer 49 Chromosomen. Er schreibt dazu:"In beiden Fällen mit 46 Chromosomen hatte ich Zweifel bei einem Element. Es könnte in Wirklichkeit doppelt sein. Es gelang nicht, mich zu versichern, ich zählte es als ein Element."

In der Äquatorialplatte der Spermatozyte I findet er 57mal 24 Chromosomen, zweimal 25 Chromosomen, einmal 23 Chromosomen, und wieder steht als Zusatzbemerkung zu diesem Ergebnis, daß ein zweifelhaftes Element als ein Chromosom gezählt wurde. In den Äquatorialplatten der Spermatozyte II findet er teils 24, teils 23 Chromosomen, im Augenblick der Mitose 47 Chromosomen, in den Tochterplatten teils 24, teils 23 Chromosomen.

Daraus resultiert für WINIWARTER als Schlußfolgerung: "Wie es zwei Arten von Präspermatiden gibt, gibt es auch zwei Kategorien von Äquatorialplatten mit 24 und 23 Chromosomen, folglich auch zwei Arten von Spermatiden." Und als Erklärung für das "zweifelhafte Element": "Dieses besondere Chromosom besitzt alle Attribute eines Heterochromosoms (nach der Definition von GUTHERZ, 1907). Es ist ein Monosom = Geschlechtschromosom, und diese Art es zu sehen, wird bestärkt durch die zahlenmäßigen Gegebenheiten bei der Frau". Die Chromosomenformel für die beiden Geschlechter hieße demnach:

♂ 46A + X ; ♀ 46A + 2X Chromosomen.

Als Kommentar zu den verschiedensten, weit differierenden Zahlenangaben einiger Autoren schreibt er: "Wie es nicht statthaft ist, zuzugegeben, daß die Chromosomenzahl von Individuum zu Individuum variiert, ist es richtiger, vor allem das Material zu beschuldigen und die schlechte Fixation."

Erst 12 Jahre nach WILSONs Benennung des Y-Chromosoms erscheint 1921 eine Arbeit von PAINTER über das Y-Chromosom der Säuger, in der er sich entschieden für den XY-Typ beim

Menschen ausspricht und nicht für den XO-Typ, wie vielfach angenommen wurde. Sein Material bestand aus frischem Operationsgewebe im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, die alle an nicht frischem, d.h. an Testisgewebe von Hingerichteten, gemacht wurde. Nur WINIWARTER bildet eine Ausnahme. Er jedoch habe das Y-Chromosom übersehen und daher die haploide Zahl von nur 23 Chromosomen gefunden. Die anderen Autoren müßten wohl die Teilungen von primären Spermatozyten und Spermatogonien verwechselt haben. PAINTER selbst nimmt die menschliche Chromosomenzahl zwischen 45 und 48 Chromosomen an. In den klarsten Äquatorialplatten findet er 46 Chromosomen! Leider entscheidet er sich 1923 für folgende Formel:

♂ 46A + X + Y ; ♀ 46A + XX ,

also wieder für die Gesamtzahl 48. Rassische Unterschiede in der Chromosomenzahl, wie WINIWARTER 1912 vermutet hatte, findet er jedoch in seinem Untersuchungsmaterial von zwei Negern und einem Weißen nicht.

1926 versucht WINIWARTER auf Grund von Studien an besserem, unbeschädigtem Material seine Ergebnisse von 1912 zu bestätigen. Er betont nochmals, nur ein Geschlechtschromosom in den Spermatogonien gefunden zu haben und bleibt bei seiner Zahl von 47 und 48 Chromosomen.

1928 berichten EVANS und SWEZY von einer ganz neuen Beobachtung, nämlich von einer signifikanten Geschlechtsdifferenz in der Länge der Autosomen somatischer Zellen beim Menschen und bei der Ratte. Weiter heißt es: "Das längste Autosomenpaar beim Mann ist länger als das längste Paar bei der Frau. Diese Differenz kann eventuell bezogen werden auf die Körpergröße, die im allgemeinen beim Mann gefunden wird."

Auf Grund der Schwierigkeit, geeignetes Material zur Chromosomenzählung zu beschaffen, stellt KEMP 1930 eine der frühesten Gewebekulturen von embyonalem Herz, von embryonaler Milz und außerdem von Karzinom (Epithelzellen) her. Unglücklicherweise ist dieser Vorstoß von Zytologen völlig vernachlässigt worden, schreibt HSU 1952.

1935 werden von CHRUTSCHOFF und BERLIN in einer Blutkultur die ersten Beobachtungen von Mitosen gemacht. Er entdeckt, daß sog. Polyblasten, die von Lymphzyten und Monozyten abstammen, sich in einem gewissen Stadium der Kultur auf mitotische Art teilen.

1937 greift KOLLER die Erforschung der Geschlechtschromosomen wieder auf und veröffentlicht einen langen Artikel über ihre genetischen und mechanischen Eigenschaften, eine Analyse des Verhaltens des X- und Y-Chromosoms. Im späten Pachytän entdeckt er eine terminale oder subterminale Assoziation von X und Y. Er deutet das irrtümlich als chiasmatische Endbindung. Viel später wird diese exakte Beobachtung von OHNO (1965) als charakteristische "End-zu-End-Verbindung" (end-to-end-association) von X und Y bestätigt, auf Grund deren die erste meiotische Teilung als die Reduktionsteilung anzusehen sei.

Die entscheidende Erkenntnis hinsichtlich der Geschlechtsdifferenzierung wird jedoch erst 12 Jahre später von BARR und BERTRAM (1949) mitgeteilt. Zunächst findet man hier eine Beschreibung der Neurone der Katze, doch dann werden die Ergebnisse an sympathischen Ganglien des Menschen nachgeprüft. Im Text heißt es: "Der Unterschied in der Kernstruktur zwischen Neuronen von erwachsenen, männlichen und weiblichen Katzen besteht im Grad der Entwicklung eines sekundären Körpers, der viel kleiner ist als der Nukleolus. Dieser Körper ist mehr oder weniger eng dem Nukleolus assoziiert und färbt sich wie letzterer gut mit basischen Farbstoffen. ... Der "nucleolar satellite" läßt sich vielleicht vom Heterochromatin der Geschlechtschromosomen herleiten. Auf Grund der doppelten X-Chromosomen besitzen die Zellen einer weiblichen Katze eine größere Menge 'nucleolar-assoziiertes' Heterochromatin als die Zellen der männlichen Katze." Auf BARR et al. (1953) geht der sog. Hauttest zurück, der heute in der Kerngeschlechtsbestimmung Verwendung findet.

1952 entdeckt HSU die Technik der Gewebekultur wieder. Er züchtet embryonale Haut und Milz und begründet seine Metho-

de mit den vielerlei Vorteilen gegenüber den histologischen Schnitten:

1. guter Überblick über die einzelnen Teilungsphasen;
2. keine Verluste;
3. die einzelnen Zellagen bieten die beste Bedingung für die direkte Beobachtung und Photographie;
4. direkte Fixation;
5. die Fixative sind wirksamer, weil sie die dünnen Zellagen leichter durchdringen.

Chromatinreiche Kernanhängsel bei neutrophilen Leukozyten, die häufiger im weiblichen als im männlichen Geschlecht auftreten, beschreiben DAVIDSON und SMITH 1954. Sie nennen diejenigen Drumsticks, bei denen sie einen Durchmesser von 1,5µ feststellen, und unterscheiden sie genau von den Kernanhängseln beim männlichen Geschlecht, die einerseits größer, andererseitskleiner als 1µ im Durchmesser sind und die bei 90-facher Vergrößerung nicht sichtbar werden wie die Drumsticks. Als Minimum sollen beim weiblichen Geschlecht 6 Drumsticks auf 500 Neutrophile vorhanden sein - eine neue, noch bequemere Methode der Geschlechtsdifferenzierung.

Als weitere Methode für die Kerngeschlechtsdiagnostik ist der Mundepitheltest von MOORE und BARR(1955) anzuführen.

Durch die Neuentdeckung alter Methoden kam es in den Jahren nach 1956 zu dem großartigen Aufschwung der Chromosomenforschung. Diese Tatsache zeigt, wie eng eigentlich neue Ergebnisse von guten Kenntnissen der Methodik abhängig sind. Ein kurzer Rückblick auf die Anfänge und auf die Entwicklung dieses Spezialgebietes sei daher angeschlossen.

3.) Methodische Fragen der Zytogenetik

Zu seinen Beobachtungen der Kernteilung benützt ARNOLD (1879) Chromsäure oder Alkohol als Konservierungsmittel FLEMMING (1880) dagegen vermeidet den Alkohol, da er dazu neigt, die Fäden in allen Phasen mit engerer Lagerung zusammenzuklumpen. Dieselbe Beobachtung macht er mit Essigsäure, die zudem die Kernfäden aufquellen soll. Er bevorzugt Pikrin- und Chromsäure mit Hämatoxylin- und Anilinfärbung. Zur Rechtfertigung seiner Ergebnisse und seiner Methoden schreibt er hinsichtlich der Längsspaltung der Kernfäden: "Wollte man ja annehmen, daß die vollständige Spaltung in zwei Längsfäden erst durch die Wirkung von Reagentien zustande käme, so müßte man doch zugeben, daß eine Disposition dazu, also ein Aufbau der Fäden aus zwei differenzierten Längshälften, dafür schon vorgelegen haben muß."

1882 findet man bei FLEMMING für die Präparation von Seeigeleiern detailliertere Angaben. Es wird inzwischen die Osmiumsäure vorgezogen, auch Salpetersäure wird verwendet. Die Färbung erfolgt direkt unter dem Deckglas durch Einsaugen von essigsaurem Karmin. "Die erwähnt Aufquellung bei der Wirkung des Essigsäure-Karmins betrifft nicht nur das Eiplasma sondern auch in einigem Grade den Kern... und es wird durch die leichte Distorsion der Figuren das Verfolgen der einzelnen Fäden erleichtert." Fließpapier dient zur Unterstützung des Deckglases und damit zur Vermeidung von Kompression. "Leichte Kompression unterstützt aber natürlich die Beobachtung." Es stellt sich die Frage, ob man das schon als Quetschmethode bezeichnen könnte.

HANSEMANN (1891) fixiert möglichst schnell mit konzentrierter,wäßriger Sublimatlösung, behandelt dann mit absolutem Alkohol nach und färbt anschließend mit verdünntem Hämatoxylin.

WILCOX (1900) modifiziert die Fixation etwas, indem er

Zenkers Lösung benützt, eine Mischung aus bestimmten Teilen Na-Bichromat, Na-Sulfat, Sublimat, Eisessig und H_2O. Anschließend dehydriert er in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Färbung besteht in Heidenhains Fe-Hämatoxylin oder Flemmings Orange Methode.

FOOT und STROBELL (1905) erhalten ihre besten Meiosepräparate bei Allolophora-Eiern dadurch, daß sie jedes Ei in einem sehr kleinen Tropfen Wasser anstechen. Sobald der Eiinhalt ausgelaufen ist, lassen sie ihn so rasch trocknen, daß sie eine prachtvolle Fixierung des Kerns in einer Art selbsttätig entstandenen Ausstrich bekommen.

1913 bringt CARREL eine bemerkenswerten Artikel über die künstliche Aktivierung von Wachstum in vitro. Unter dem Einfluß von "Gewebssaft" habe die Wachstumsrate unter Umständen von 3-fach bis zu 40-fach zugenommen. Die stärkste, stimulierende Wirkung habe Embryonalextrakt, weniger Extrakt von Erwachsenenmilz und von Rous-Sarkoma. Eine erhebliche Verminderung finde sich bei Verdünnung, nach Erhitzen und nach Filtrieren durch ein sehr engmaschiges Filter (die Wachstumsrate entspricht dann der Ringerlösung). Außerdem fand sich nur eine Stimulierung von homologem Gewebe.

Erst 1934 wird von LEWIS wieder eine entscheidende Beobachtung gemacht (erwähnt auch bei SLIFER, 1934). Lebende Zellen von Hühnerembryonen werden mit hypotoner Lösung (<0,6% NaCl) behandelt. Sie zeigen eine reversible Auflösung der Spindel, eine Zerstreuung der Chromosomen und Hemmung der Mitose. Leider geriet diese Entdeckung etwa zwei Jahrzehnte in Vergessenheit, bis sie mehr oder weniger absichtlich von HUGHES und HSU (1952) wieder aufgegriffen wird.

1935 demonstriert HEITZ mit Vicia faba seine neue Nukleal-quetschmethode. Unverletzte, ganze Zellen werden 15 Minuten in Chrom-Osmiumsäure fixiert, anschließend 10-20 Minuten in n-HCl bei 60°C hydrolysiert, um die härtende Wirkung der Chromsäure wieder aufzuheben und die Kernmembranen zu mazerieren. Nachdem 20-30 Minuten in H_2O gespült wurde, bringt man

die Zellen mit 45%-iger Essigsäure auf den Objektträger und quetscht sie zur Ausbreitung unter leichtem Druck. Für Kern- und Chromosomenuntersuchungen sollen die Zeiten jeweils etwas verlängert werden, zusätzlich wird mit fuchsinschwefliger Säure gefärbt.

Die Grundlagen für Blutkulturen geben CHRUSTSCHOFF und BERLIN (1935) mit ihren ersten Beobachtungen von Mitosen. Sie gehen davon aus, daß Polyblasten, die von Lymphozyten und Monozyten abstammen, während des Stadiums der Mutation in stabile Zellen (Fibrozyten) sich besonders stark mitotisch teilen. Um eine maximale Zahl von Mitosen zu erhalten, sei die beste Zeit für die Fixation die ersten oder zweiten 24 Stunden nach der Erneuerung des Mediums. Als Material wird ein Plasmakoagulum verwendet, das reichlich Leukozyten enthält. Auf einem Deckglas wird es in einen hermetisch abgeschlossenen Behälter gebracht und bei 37°C inkubiert. Das hypotone Anfangsmedium besteht aus einer Mischung von Kaninchen- und menschlichem (autogenem) Plasma, von Embryonalextrakt und von Autohämolysat, da ein Faktor der Erythrozyten die Umwandlung von labilen in stabile Formen beschleunigen soll. Erneuerung des Mediums am 4.Tag nach Ansetzen der Kultur und anschließend Fixation nach 48Stunden. Die Erneuerung des Mediums begünstige die Mitoserate und verzögere neue Umwandlungen. Der Grund für das hypotone Medium sei eine weniger engmaschige Ausbildung des Fibrinnetzes und damit eine Begünstigung der Diffusion mitosefördernder Stoffe. Die Fixierung erfolgt mit Flemmingscher Lösung (Chrom-Osmium-Essigsäure) und die Färbung nach Feulgen.

Einen Schritt weiter in Richtung der modernen Techniken bringt die Erforschung des Einflusses von Kolchizin auf die Karyokinese von GAVAUDAN (1937). Eine beträchtliche Vermehrung der Mitosezahl verbunden mit einem sekundär inhibitorischen Effekt wird vermerkt. Durch Fehlen der Funktion des Spindelapparats findet man die Chromosomen ohne Ordnung zerstreut, die Anzeichen der Bipolarität bestehen noch, aber die

Chromosomen bleiben oft zu Paaren assoziiert.

Eine genauere Beschreibung des Kolchizineffektes geben LEVAN und ÖSTERGEN (1943) und ÖSTERGEN (1944). Besonders erwähnt wird die zusätzliche Kontraktion der Chromosomen auf Grund der Kolchizinwirkung.

1948 versucht FISCHER wesentliche wachstumsfördernde Faktoren eines Kulturmediums zu finden. Embryonin nennt er den Stoff, der im Embryonalextrakt enthalten ist. Außerdem hält er Glutamin und Fruktosediphosphat für wesentliche Bestandteile.

1950 wird dann erstmals von MORGAN ein rein synthetisches Medium zusammengestellt, das das Leben der Zellen für ca. 4-5 Wochen unterstützt. Es enthält weder Blutserum noch Embryonalextrakt. Viele bekannte Nährfaktoren wie Aminosäuren, Purine, Pyrimidine, Pentose-Zucker werden der basalen Lösung mit gutem Erfolg beigefügt, ohne daß die einzelnen Bestandteile einen offensichtlichen Effekt zeigen. Allein Adenosintriphosphorsäure (ATP) zeigt keine wesentliche Wirkung auf das Überleben der Zelle.

1952 entdeckt HSU die Möglichkeit einer Gewebekultur und die damit verbundenen Vorteile wieder (siehe KEMP, 1930). Kleine Stückchen embryonaler Haut und Milz werden auf einem Koagulum, das aus dem Extrakt eines Hühnerembryonen besteht, mit maligner, menschlicher Aszitesflüssigkeit inkubiert. Es ergeben sich sehr gut ausgebreitete Metaphasen, weil die Kulturen irrtümlicherweise vor der Fixation anstatt in isotoner in hypotoner Tyrode-Lösung gewaschen wurden.

Zur gleichen Zeit betreibt HUGHES die hypotonische Behandlung etwas wissenschaftlicher. Er findet nach einer Behandlung von 15 Minuten mit hypotoner Tyrode-Lösung (auf 20% verdünnt) die Teilung der meisten Zellen in der Vor-Prophase oder in verschiedenen Metaphasestadien gehemmt; die gepaarten Chromatiden sind über die Zelle verstreut. Daraus schließt HUGHES, daß die sich teilenden Zellen sensibler gegen hypotone Lösungen sind als intermitotische Zellen.

SLIZYNSKI berichtet 1952 von einer modifizierten Quetschmethode. Statt eines Deckglases verwendet er Zellophanpapier und vermittelt den Druck durch Rollen eines Teströhrchens. Nach wenigen Minuten kann das Zellophan unter Wasser leicht abgelöst werden.

Eine praktische "Trockenmethode", um Deckglas und Objektträger auch nach vorheriger Paraffineinbettung zu trennen, findet CONGER (1953). Er friert das Material ein, indem er das Präparat kurz auf einen Eisblock legt. Mit nur geringem Materialverlust lassen sich die beiden Teile lösen. Anschließend sollen die gefrorenen Präparate sofort in hochkonzentriertem Alkohol dehydriert werden und können damit als Dauerpräparate aufbewahrt werden.

EAGLE (1955) entdeckt bei der Suche nach einem optimalen Medium für die Zellinie L und HeLa zwei Lösungen mit verblüffend gleichem Gehalt. Versuche mit verschiedenen anderen Kulturen ergeben, daß die Medien sich für alle ausgezeichnet eignen. Fehlte einer der Faktoren, so degenerierten die Zellen. Im wesentlichen besteht der Inhalt aus Aminosäuren, aus Vitaminen, Salzen (Na, K, Ca, Mg, Cl, H_2PO_4-Ionen), außerdem aus Glukose, Penizillin, Streptomyzin und aus 10% dialysiertem menschlichem Serum. So kann also endlich das bisherige, "geheimnisvolle" Medium aus balanzierter Salzlösung, Serum und Gewebsextrakt durch eine mehr oder weniger exakt festgelegte Lösung ersetzt werden.

Der entscheidende Schritt wird,wie schon erwähnt, 1956 von TJIO und LEVAN getan. Besonders die Verwendung von drei wesentlichen Bestandteilen der verbesserten, methodischen Technik führt zu solch ausgezeichneten Präparaten. Erstens ist es die Anwendung des Spindelgiftes Kolchizin, das außerdem eine übermäßige Kontraktion der Chromosomen veranlaßt; zweitens die hypotonische Vorbehandlung, die auf ein Minimum von 1-2 Minuten beschränkt wird und dadurch die Chromosomenkonturen nicht mehr verschwommen erscheinen läßt; und zuletzt die Antibiotika, die einen beträchtlichen Beitrag zur Stabi-

lisierung des Kulturmediums liefern.

Die Epoche dieser ersten historischen Daten ist somit abgeschlossen. Die Chromosomenforschung ist nun in ein neues Stadium der experimentellen Entwicklung eingetreten.

III HEUTIGER STAND DER KLINISCHEN ZYTOGENETIK UND IHRER METHODEN

Den Begriff der klinischen Zytogenetik definiert BÖÖK (1961) als einen speziellen Zweig der medizinischen Genetik, der sich mit jenen Chromosomenveränderungen beschäftigt, die mit Krankheiten oder Defekten verbunden sind. Das Ziel ihrer Methoden, d.h. der zytologischen Technik, ist, eine Präparation zu erreichen, bei der die Chromosomen in einer Ebene ausgebreitet sind und sich möglichst wenig überschneiden (FERGUSON-SMITH et al., 1962). Die Diskussion über die Wirkung der seit 1956 allgemein verwendeten Reagenzien und über den Sinn ihrer Anwendung ist immer noch nicht beendet.

Besonders die Verwendung von Kolchizin wird erörtert. FRACCARO (1961) hält es sogar für unnötig. Er habe ohne Kolchizin gleich gute Erfolge erzielt. TAYLOR (1965) versuchte, mit markiertem Kolchizin den Hemmungsmechanismus zu erforschen. Er findet, daß Kolchizin die Zellmembran entsprechend der Außenkonzentration sehr schnell durchdringt und ebenfalls entsprechend der Konzentration, aber relativ langsam, von bestimmten Proteinen ("binding sites") an Interphasenzellen gebunden wird. Die makromolekulare Synthese in der Interphase wird nicht betroffen. Bei einer Konzentration von mindestens 2×10^{-7}M werden die Zellen in der Metaphase sofort geblockt, bei wesentlich geringerer Konzentration in der Prophase. Entsprechend der Verdünnung der Kultur wird von den Zellen langsam Kolchizin verloren. Doch die blockierende Wirkung bleibt bestehen, solange das gebundene Kolchizin über einem bestimmten, kritischen Wert liegt. Nach KOULISCHER (1963) soll die Blockierung nur die Entwicklung der Mitose und der Zellteilung, d.h. die Ausbildung der Spindel, betreffen, nicht aber die Teilung der Chromosomen selbst, die seiner Meinung nach weiter abläuft und unter normalen Bedingungen ohne Zweifel nach der Metaphase stattfindet. Als Beweis führt er bei Kulturen, die nicht behandelt wurden, die einfache Struktur in

der Metaphase an. Andere Autoren halten die Depolarisation nicht für ein Privileg des Kolchizins. Sie beobachten eine ähnliche Wirkung mit EDTA (LEJEUNE, GAUTIER und TURPIN, 1959, zit. nach EGGEN, 1963), mit Chloralhydrat, mit Äthyl-, Phenyl-, Monomethylurethan, mit Sarkomycin und Aloin und mit Patulin (BIESELE, 1962). Als Nachteile werden in allen Fällen sekundäre Chromosomenbrüche und ähnliche Beschädigungen der Chromosomen beschrieben. Vor der Anwendung von niederen Temperaturen (+3°C) warnen HAMPEL und LEVAN (1964), weil sie auch dadurch bei 20-40% der Zellen Chromosomenbrüche induziert sahen.

Auch die hypotonische Vorbehandlung mit anschließender Lufttrocknung wird von SCHWARZACHER und SCHNELL (1965) nicht für völlig geeignet gehalten. Sie beobachten in 0,5-5,8% der Mitosen von euploiden Fibroblasten Tetraploidie mit wahllos verteilten Chromosomen.

1.) Geschlechtschromatinuntersuchung

Obwohl seit der Entdeckung der sog. "Barr-bodies" (BARR und BERTRAM, 1949) und der "Drumsticks" (DAVIDSON, 1954) als geschlechtsspezifische Kernanhängsel in der Interphase die Geschlechtschromatinuntersuchung fast zu einer Routineuntersuchung geworden ist,kan die Diskussion über eindeutige Spezialfärbungen, aber auch über ihre Herkunft und Bedeutung noch nicht als abgeschlossen betrachtet werden.

Zunächst erhob sich die Frage, ob diese beiden Formen überhaupt identische Ausprägungen des gleichen Sachverhaltes darstellen. Durch die verschiedenen Präparationsmethoden und die dadurch bedingten Größenunterschiede waren Zweifel entstanden, die aber durch den direkten Vergleich von Leukozyten und Leberzellen (Verwendung von Lebersinusoiden) beseitigt werden konnten (DAVIDSON und WINN, 1959). Die angegebenen Durchmesser schwanken zwischen 1-2µ.

Zur Darstellung bieten sich verschiedene Möglichkeiten an. Die bequemste und damit auch die am häufigsten verwendete ist, ein Ausstrichpräparat von Wangen- oder Vaginal-(Urethral-)Schleimhaut zu untersuchen. Die Fixation erfolgt, ohne dem Präparat zum Trocknen Gelegenheit zu geben, im allgemeinen mit 95%-igem Alkohol (KLINGER und LUDWIG, 1957 und GUARD, 1959), kann nach 10 Minuten als genügend angesehen werden und soll nicht länger als 24 Stunden dauern. BARR (1965) empfiehlt anschließend kurz aufeinanderfolgende Bäder in absolutem Alkohl, in 0,2%-iger Parlodionlösung, in gleichen Teilen von absolutem Alkohol und Äther, eine kurze Lufttrocknung, darauf Eintauchen in 70%-igen Alkohol und dann ein zweimaliges Spülen mit destilliertem Wasser, GUARD (1959) ein einmaliges in 70%-igem Alkohol. PANSEGRAU und PETERSON (1964) verwenden ausschließlich 70%-igen Alkohol.

Die Vielfältigkeit der Färbemethoden ist noch wesentlich größer. Eigentlich werden von sämtlichen gängigen Far-

ben gute Ergebnisse beschrieben. Erwähnt werden Kresyl-echt-Violett, Hämatoxylin(-Eosin), Methylgrün-Pyronin, Acetoorcein (BARR, 1965), außerdem Gallocyanin (KLINGER und LUDWIG, 1957). BARR empfiehlt besonders Karbolfuchsin als Routinemethode, KLINGER und LUDWIG die Feulgen'sche Methode und ganz besonders gepuffertes Thionin nach salzsaurer Hydrolyse, was einfacher, schneller, billiger und besser sei als die Verwendung von Ribonuklease zur Herauslösung der Grundproteine. Die Spezifität des Thionin ist zwar nicht besonders hoch, doch sind die Ergebnisse gut, weil zuvor alle störenden, basischen Substanzen herausgelöst werden, und weil die von Thionin ausgeschickten, kurzen blauen Wellenlängen zum Teil für die detailliertere Auflösung verantwortlich seien. KLINGER und LUDWIG warnen vor der Färbung mit Hämatoxylin wegen der Möglichkeit, Nucleoli mit Barr-bodies zu verwechseln. Eine Spezialfärbung für die Barr-bodies entwickelt GUARD (1959) nach dem Prinzip, daß das stärker basische "fast-green" das schwächere "Biebrich-scarlet" überall verdrängt, nur nicht von dem stark sauren Sexchromatinkörper, der dann rot gegen den grün gefärbten restlichen Kern kontrastiert. Ein optimaler pH-Wert (mit 15%-igem Eisessig) und eine bestimmte Temperatur (20-25°C) reduzieren die Differenzierung mit "fast-green" auf 25-30 Minuten, nach der sonst unwesentlichen Modifikation von PANSEGRAU und PETERSON (1964) sogar auf 19-24 Minuten. Bei einer Überschreitung bestehe die Gefahr, zu Unrecht negativ Ergebnisse zu bekommen. Abgesehen davon garantieren PANSEGRAU und PETERSON für 100%-ige Genauigkeit der Methode.

Zur Fixation von Gewebsstückchen, die nicht dicker als 0,5cm sein sollen, wird Davidsons Lösung verwendet (KLINGER und LUDWIG, 1957 und BARR, 1965), eine Mischung aus 95%-igem Alkohol, Formalin, Eisessig und destilliertem Wasser. Damit wird die unerwünschte Härtung mit reinem Alkohol vermieden. Zur Dehydrierung werden kürzere Zeiten empfohlen (BARR, 1965), um nach Möglichkeit Schrumpfungsprozesse und Pyknosen zu vermeiden. Für die Schnitte von ca. 5µ können die üblichen Fär-

bemethoden verwerdet werden. Bei Langzeitkulturen wird eine Abnahme des Sexchromatins beobachtet.

Eine häufige, wenn auch nicht ganz so sichere Methode zur Bestimmung des Kerngeschlechts ist die Untersuchung der Leukozyten auf Drumsticks. Die Methode ist sehr einfach, es genügt meistens sogar die Routinetechnik. Empfohlen wird, den Ausstrich an der Luft zu trocknen, um eine Beschädigung der Leukozyten zu vermeiden, und nach Wright (MURTHY und VON HAAM, 1958), Jenner-Giemsa, Hämatoxylin-Eosin, Feulgen (DAVIDSON und FLUTE, 1962) zu färben. Laut DAVILSON und FLUTE konnten Drumsticks nur noch in Eosinophilen und Basophilen erkannt werden, während MURTHY und VON HAAM außerdem auch in Monozyten und Lymphozyten bestimmte Kernanhängsel als Sexchromatin identifizierten. Daraus ergibt sich schon die Schwierigkeit, unspezifische Kernanhängsel, wie "small clubs", "rackets" ... von den Drumsticks zu unterscheiden, zu denen auch die "sessil nodules" gerechnet werden sollen (KLEINT und KOTTE, 1964 und BARR, 1965). Eine weitere Schwierigkeit der Beurteilung besteh in der Zu- bzw. Abnahme ihrer Häufigkeit bei Rechts-bzw. Links verschiebung der Granulozyten. Aus diesem Grunde wird neben einer genauen Beschreibung verschiedener Erkennungsmerkmale von DAVIDSON (1954) empfohlen, nur die chromatinreichen Anhängsel als echte Drumsticks zu zählen, die bei 90-facher Vergrößerung zu sehen sind, bzw. einen Durchmesser von mehr als 1µ haben.

Die Frage, warum die Drumsticks nur in so geringer Häufigkeit (0,5-10% gegenüber 20-60% Barr-bodies) auftreten, obwohl sie doch die halbe Sexchromatinmenge darstellen, wird von DAVIDSON und FLUTE (1962) folgendermaßen beantwortet: "Es scheint wahrscheinlich, daß in schnell sich teilenden Zellen das Chromatinmaterial nicht in einem geeigneten Stadium ist und erst später in den funktionellen Stadien ohne Teilungsprozeß die charakteristischen Anhängsel oder Drumsticks geform werden." Als Beweis, daß der Kopf des Drumsticks tatsächlich nur die Hälfte des Sexchromatins enthält, führen DAVIDSON

und FLUTE das Verhältnis des X-Chromosomenpaares zu den gesamten Chromosomen (1:18) und die Masse des Drumstickkopfes zur gesamten Kernmasse (1:34) an. Es ergibt sich daraus das erwartete Ergebnis.

Völlig anders sehen KLEINT und KOTTE (1964) die Erscheinung der Drumsticks. "Überwiegend jedoch gelten heute die Trommelschlegelkörperchen lediglich als Geschlechtsmerkmal, d.h. als 'morphologischer Ausdruck eines geschlechtsspezifischen Stoffwechselgeschehens', das aber nicht von den Keimdrüsen, sondern von den Chromosomen selbst gesteuert wird. Gegen eine prinzipielle Gleichsetzung von Sexchromatin und Drumsticks sind vor allem folgende Einwände erhoben worden: erstens die wesentlich geringere Frequenz der Drumsticks, zweitens die Altersabhängigkeit der Drumstickhäufigkeit, nicht aber des Sexchromatins, drittens der teilweise geglückte, gleichzeitige Nachweis von Drumsticks und Sexchromatin in einer Zelle; sowie schließlich der Umstand, daß bei Patienten mit XXX-, XXXY- bzw. XXXXY-Chromosomenkonstitutionen Körperzellen mit doppeltem, ja dreifachem Sexchromatin, zum Teil sogar in großer Anzahl, dagegen fast nie Leukozyten mit zwei Drumsticks gefunden werden."

Auch KÖBBERLING (1966) bearbeitete das Phänomen der Drumsticks. Bei seinen Beobachtungen lebender Granulozyten im Phasenkontrastmikroskop und im Tropfenpräparat sah er keine Drumsticks, aber deutlich chromatindichte Strukturen. Etwa 30% der Granulozyten weiblicher Individuen besaßen ein Chromozentrum mehr als die entsprechenden männlichen Zellen, welches sich in Form, Größe und färberischem Verhalten nicht von Sexchromatinkörperchen anderer Zellen unterschied. Er schloß daraus, daß die Häufigkeit der Kernanhängsel weitgehend von der Art der Präparation abhängig ist. "Ein Unterschied im Segmentierungsgrad, der zu unterschiedlichen Häufigkeiten von Drumsticks führt, kann zur Erklärung nicht herangezogen werden, da der Index aus Umfang und Fläche bei den Zellen im Tropfenpräparat durchschnittlich etwas höher liegt als bei

den Ausstrichzellen." KÖBBERLING folgert weiter: "Das Fehlen einer Verknüpfung mit anderen Kernstrukturen durch euchromatische Brücken, sowie die enge Verbindung mit der Kernmembran könnten dafür verantwortlich sein, daß von den größeren Chromozentren nur das geschlechtsspezifische die Fähigkeit hat, als Drumstick aus der Kernmasse ausgestülpt zu werden." Diese Fähigkeit beruht nach GOTHE und HINRICHSEN (1959) auf Viskositätsunterschieden, die beim Ausstreichen der Zellen auf dem Objektträger die Veranlassung dafür sind, daß sich das weniger visköse Kernplasma von dem rigiden Heterochromatinkomplex mehr oder weniger weit retrahiert. Damit wäre die Grundlage geschaffen, auch die Drumsticks als eine Ausdrucksform der inaktivierten X-Chromosomen zu betrachten. Nach einer weiteren Arbeit von KÖBBERLING (1966) liegt die maximale Zahl von Drumsticks ebenfalls um eins niedriger als die Zahl der X-Chromosomen in den Kernen des entsprechenden Individuums.

Trotzdem warnt KÖBBERLING vor einer Geschlechtsdiagnose auf Grund der Drumsticks. "Obgleich sich die Werte für die Präparate männlicher und weiblicher Versuchspersonen nicht überlappen, kann eine scharfe Grenze zwischen ihnen nicht gezogen werden."

Vollständig gelöst ist das Problem der Drumsticks immer noch nicht.

Etwas besser erforscht ist augenblicklich die Erscheinung der Barr-bodies. Ursprünglich wurde angenommen, daß das Geschlechtschromatin die zwei heterochromatischen Regionen der beiden X-Chromosomen repräsentiere. Die Grundlage für diese Annahme war der allgemeine Glaube, daß positive Heteropyknosis und Bildung eines Interphase-Chromozentrums für jede heterochromatische Region gelte (OHNO, KAPLAN und KINOSITA, 1961). Das besondere Verdienst von OHNO und seinen Mitarbeiterr (OHNO und NAKINO, 1961; OHNO, KAPLAN und KINOSITA, 1961) war es, "the single-X nature of sexchromatin in man" festgestellt zu haben. Mit Hilfe von markiertem Thymidin und elektronenmikroskopischen Untersuchungen gelang es, diese Neuerung de-

taillierter zu erforschen. Das spät markierte X-Chromosom wurde nahe der Peripherie gefunden, genau so häufig wie das Sexchromatin in den Interphasenkernen (ATKINS und SANTESSON, 1964). Durch exakte Messungen haben HINRICHSEN und KÖBBERLING (1966) nachgewiesen, "daß die randständige Lage (des Sexchromatins) häufiger zu finden ist, als es der zufälligen Verteilung an der Kernoberfläche entspricht." Es bleibt jedoch die Frage offen, "ob die periphere Lage des allozyklischen X-Chromosoms in Metaphasenplatten und die Membran-, Rand- und Polständigkeit des Sexchromatins durch gleiche Mechanismen bedingt sind."

"Beachtenswert ist die Struktur des Barr-body, dessen heteropyknotische Masse sich mit isopyknotischen zweigeteilten Fortsätzen im Chromatingerüst des Kerns verliert. ... Es sind also durchaus Hinweise dafür gegeben, daß nur ein Teil des X-Chromosoms, wenn auch der größere, zum Barr-body wird!" (EBERLE, 1966) Fasern, Stäbchen und zirkuläre Komponenten mit einem Durchmesser von ca. 200Å scheinen die einzigen Bestandteile des Sexchromatins zu sein. Es findet sich eine beträchtlich geringere Dichte des Sexchromatins als der Metaphasenchromosomen. Die Fasern des Sexchromatins, die etwas entfernt von der Kernperipherie liegen, erscheinen kompakter organisiert zu sein als die an der Kernperipherie (WOLSTENHOLME, 1965).

SIEBNER (1964) versuchte,mit radioaktivem Thymidin Barrbodies in Blut- und Knochenmarkkulturen nachzuweisen. "Es gelang nicht mit Hilfe verschiedener, spezifischer Färbemethoden anstelle der randständigen Silbergranulaanhäufung Chromatinverdichtungen nachzuweisen, wie das bei den Fibroblasten der Fall war. Vielleicht ändert sich das färberische Verhalten des Heterochromatins in hämatopoetischen Geweben gegen Ende der S-Periode. Nach SCHWARZACHER wäre das durch die Vorbehandlung mit hypotoner Salzlösung."

Die Bedeutung des heteropyknotischen X-Chromosoms wurde durch die Hypothese von LYON (1961, 1962) schon mehr oder

weniger in vollem Umfang erkannt. Inzwischen sind die verschiedenen Punkte durch weitere Untersuchungen gesichert. Der Beweis für die Inaktivität des heteropyknotischen X-Chromosoms, väterlicher oder mütterlicher Herkunft, wird durch verschiedene Mosaikeffekte geliefert, z.B. bei G-6-PD-Defekt (DAVIDSON et al., 1963, zit. nach EBERLE, 1966; SANSONE et al., 1964) und bei unvollständig ausgeprägter Farbenblindheit (LYON, 1961). Allein die Reduplikation, d.h. die DNS-Synthese, kann man als geringgradige genetische Aktivität bezeichnen (GILBERT et al., 1962).

Die Inaktivierung eines beliebigen X-Chromosoms, vielleicht auch bevorzugt des anomalen X-Chromosoms (MILLER et al., 1963), erfolgt 10-12 Tage p.ov. im Trophoblasten, d.h. dort erscheinen die ersten Barr-bodies. Im Embryoblasten selbst treten sie erst am 18. Tag p.ov. auf (PARK, 1957). Das könnte eventuell ein Beweis für die Fremdinduktion durch die Mutter sein, da ab dem 10. Tag p.ov. die mütterlichen Gefäße eröffnet werden (EBERLE,1966). Das Fehlen von Barr-bodies in frühen Embryonen hängt nach der Vermutung von AUSTIN und AMOROSO (1957, zit. nach MITTWOCH, 1965) mit der Größe ihrer Kerne zusammen. Das Sexchromatin wird ihrer Meinung nach erst gebildet, wenn die Kerne genügend klein sind. Diese These würde mit der Beobachtung von MITTWOCH (1965) übereinstimmen, daß die Kerne ohne Barr-bodies oder Chromozentren die Tendenz zeigen, größer zu sein als die mit heteropyknotischen Bestandteilen. An Hand dieser Beobachtungen muß also angenommen werden , daß die Auswirkung gonosomaler Störungen allein auf einer Fehlentwicklung während dieser 10-18 Tage beruht.

Die Annahme, daß bei Anomalien immer das abnorme X-Chromosom inaktiviert wird, findet sich durch entsprechende Größenvariationen der Barr-bodies und der Drumsticks bestätigt. Zusatz oder Zerstörung von genetischem Material äußern sich in Zu- und Abnahme der Größe (KÖBBERLING, 1966 und BAMFORD et al., 1966).

In den Oozyten findet sich während der Meiose kein He-

terochromatin (OHNO et al., 1961), dagegen erscheint in menschlichen Spermatozyten das XY-Bivalent in Form eines "sex-vesicle" heteropyknotisch (SACHS, 1954; zit. nach MORISHIMA, 1962).

Zum Schluß dieses Kapitels sei noch eine Bemerkung über gewisse Schwankungen in der Zahl und Ausbildung der Barr-bodies angefügt, um auf die Möglichkeit einer falschen Interpretation der Ergebnisse hinzuweisen. Verschiedene Autoren beschreiben, daß bei erhöhtem Oestrogenspiegel (SMITH et al., 1962; TAYLOR, 1963; CARATZALI, 1963; WEGMANN und SMITH, 1964; SHETTY et al., 1966) und bei erhöhtem Kortisonspiegel (SMITH et al., 1962; WEGMANN und SMITH, 1964; SHETTY, 1966), bzw. bei Stress, die Häufigkeit des Sexchromatins in buccalen Zellen erheblich reduziert ist. Das bedeutet Abnahme während der ersten Hälfte des Zyklus (DÖMÖTRI, 1964), Abnahme während und nach normaler Geburt für Mutter und Kind, Abnahme entsprechend einer Hormontherapie und Abnahme während einer Infektion (KLEINT und KOTTE, 1964).

2.) B l u t - u n d K n o c h e n m a r k k u l t u r

Zunächst zur Blutkultur, die inzwischen - nachdem die Schwierigkeit der Kultivierung überwunden ist und die Frage nach der Herkunft der proliferierenden Zellen ziemlich geklärt scheint - in der Bedeutung an erster Stelle steht. Das liegt wohl darin begründet, daß das periphere Blut wegen seiner einfachen Gewinnung in ausreichender Menge heute die beste Quelle für Mitosen menschlicher Zellen darstellt.

Der erste Vorstoß in dieser Richtung ist HUNGERFORD et al. (1959) zu verdanken, der mit seiner Chromosomenanalyse an kultivierten Leukozyten die Methode von OSGOOD und BROOKE (1955) etwas modifiziert wiederaufleben ließ. Er verwendet schon die heute für die Blutkulturen feststehenden Grundprinzipien. 15-30ml Blut werden mit einer entsprechenden Menge Phytohämagglutinin (PHA) versetzt, um die Sedimentationsrate zu beschleunigen. Die anschließende Kühlung auf $+4^{o}C$ ist nach MELLMAN et al. (1962) unnötig, da die Leukozyten bei Zimmertemperatur bis zu 24 Stunden lebensfähig sind und später so oder so bis auf die Lymphozyten absterben. Um die Sedimentation der Erythrozyten zu vervollständigen, wird langsam zentrifugiert, was nach neueren Erkenntnissen einen erheblichen Leukozytenverlust zur Folge haben kann. Die Zellen werden im Kulturmedium resuspendiert, das außer TC-199 bei OSGOOD und BROOKE Pleuralflüssigkeit, bei HUNGERFORD dafür menschliches Plasma und außerdem Penicillin und Streptomycin enthält, um die ungünstige Einwirkung bakterieller Verunreinigung auszuschließen. Für besonders wichtig wird die Tiefe der Kultur gehalten. Bis heute ist man sich noch nicht im klaren, in welcher Weise sich eine bestimmte Menge Medium, bzw. eine gewisse Zelldichte auf das Wachstum der Kultur auswirkt. OSGOOD und BROOKE empfehlen, eine genügende Menge CO_2 zuzufügen, während HUNGERFORD darauf Wert legt, daß periodisch frisches Serum zugegeben wird.

Beide Autoren weisen damit indirekt darauf hin, daß das Entstehen eines alkalischen pH-Wertes vermieden werden muß, weil die Folge eine Zelldegeneration wäre. MELLMAN (1965) berichtet, daß auch eine sogenannte endogene Säureproduktion durch Erythrozyten und polymorphkernige Leukozyten, also durch Zellen, die sich nicht an den Teilungsvorgängen beteiligen, zu demselben Effekt führt.

OSGOOD und BROOKE (1955) entnehmen der Kultur nach unterschiedlich langen Intervalleneine Probe in Form eines Objektträgers, an dem die Zellen ebenso wachsen wie auf dem Boden und am Rand. Nach dem Fixieren wird das Präparat an der Luft getrocknet, eine Vorwegnahme von ROTHFELS und SIMINOWITCH's (1958) bekannter und beliebter Technik.

Nichts ahnend von der zweiten, wesentlichen Wirkung von PHA, betont HUNGERFORD et al. (1959) die optimale mitotische Aktivität nach drei- bis viertägiger Inkubation. NOWELL (1960) bearbeitet dieses Phänomen eingehender und kommt zu dem Ergebnis, daß PHA nicht die Mitose selbst stimuliert, sondern die Zellen in ein Stadium bringt, das der Mitose vorangeht und in dem die Zellen zur Teilung fähig sind. Er betont, daß diese Wirkung nicht auf der Entfernung der Erythrozyten durch Agglutination beruht, da PHA auch im Ganzblut Mitosen induziert. Die mitosestimulierende Aktivität ist stark abhängig von den Extraktions- und Konservierungsmethoden. Nach LECLERCQ (1966) ergeben nur mit Isopropylalkohol hergestellte Extrakte aus frischen Bohnen zufriedenstellende Erfolge. Der beste mitosestimulierende Effekt werde mit 0,4ml PHA/ 10ml Plasma erreicht. Bei größeren Konzentrationen (1,6 und 3,2ml) fänden sich Zeichen von Zytotoxizität, wie agglutinierte Zellen und pyknotische Kerne.

Die heute mit geringen Modifikationen allgemein verwendete Methode ist die Kurzzeitkultur von MOORHEAD et al. (1960). Die benötigte Blutmenge schwankt zwischen 5-10ml venösem Blut, bzw. 8-10ml leukozytenhaltigem Plasma. Unter streng sterilen Bedingungen wird das heparinisierte Plasma mit

0,2 (MOORHEAD et al., 1960; FERGUSON-SMITH et al.,1962; DAS et al., 1965) - 0,5ml (FERGUSON-SMITH, 1964) PHA versetzt und für ca. 1 Stunde (MOORHEAD et al., 1960; TANAKA et al., 1963) auf +4-5°C, d.h. ins Eisbad gebracht, was zur schnelleren Sedimentation der Erythrozyten beitragen soll (DAS et al., 1965). Nach MELLMAN (1965) dagegen wird die Sedimentationsrate bei Temperaturen unter 20°C vermindert. Anschließend wird für ca. 4-10 Minuten bei 200-400 U/min. zentrifugiert. Man erhält eine Zellsuspension von $1,0-1,2 \times 10^6$ Leukozyten/ml Plasma. FERGUSON-SMITH et al. (1962) schlägt eine Unterkühlung (auf +4°C) über Nacht vor, um damit die Zellen zu synchronisieren und eine größere Ausbeute zu bekommen.

Eine höhere Konzentration wird mit einfacher Sedimentation durch Gravität erreicht, da hierbei keine Leukozyten verloren gehen wie beim Zentrifugieren. Nach 1 (MELLMAN, 1965) bis 3 (SCHMID, 1963) Stunden erhält man $12-24 \times 10^6$ Leukozyten/ml Plasma. Diese Menge ergibt sich bei gesunden Menschen mehr oder weniger konstant, sodaß man sich die routinemäßige Kontrolle der Zellkonzentration sparen kann. Die geringe "Verunreinigung" durch eventuell vorhandene Erythrozyten und polymorphkernige Leukozyten stört die Vermehrung der mononukleären Leukozyten nicht.

Wenn nicht schon vorher, so wird jetzt mit dem Kulturmedium (10-40% autologes oder homologes Plasma, 60-70% TC-199, Penicillin und Streptomycin) PHA zugefügt. Zur Kontrolle des pH-Wertes wird vielfach noch ein Indikator verwendet, bzw. 0,1 nHCl oder CO_2 zugegeben (zur Erhaltung eines pH-Wertes von 7,0-7,2). Nach MELLMAN (1965) und DAS et al. (1965) reicht dafür das "endogen" gebildete CO_2 aus, wenn die Kultur luftdicht verschlossen ist. DAS et al. (1965) hält auch TC-199 für entbehrlich und kultiviert der Einfachheit halber die Leukozyten nur in autologem Plasma.

Einer Inkubation von 60-72 Stunden folgt die Zugabe von Kolchizin in einer Endkonzentration von $0,5-1,0 \times 10^{-6}$M (MOORHEAD et al., 1960; DAS et al., 1965), 2 Tropfen / 1ml

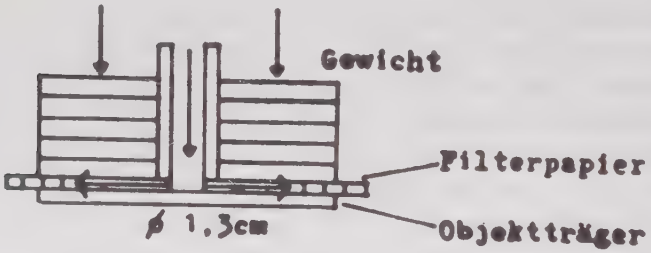
einer isotonen Kolchizinlösung zu 0,04% (LEJEUNE, 1965) oder 0,05ml in einer Endkonzentration von 0,4ug/ml (MELLMAN, 1965) bzw. entsprechenden Mengen von Derivaten. Eine weitere Inkubation von 2-4 Stunden schließt sich an. Eine längere Dauer ergibt verklumpte, überkontrahierte Chromosomen. Dieser Gefahr versuchen ROTHFELS und SIMINOVITCH (1958) zu entgehen, indem sie die Kolchizinkonzentration auf 0,0025% verringern und dafür die Einwirkungszeit auf 12-18 Stunden ausdehnen.

Danach wird zentrifugiert (600-800U/min), der Überstand verworfen, eventuell noch einmal gespült und dann mit 1,5-2ml destilliertem Wasser verdünnt (MOORHEAD, 1960; MELLMAN, 1965) oder resuspendiert mit warmer (37°C) 1%iger Na-Zitrat-Lösung (FERGUSON-SMITH et al., 1962; SCHMID, 1963; EGGEN, 1963 u.a.) oder mit 0,93%igem menschlichem Serum (LEJEUNE, 1965). Anschließende kurze Inkubation von 3-10 Minuten, wodurch der sog. hypotonische Schock erreicht wird.

Es folgt erneutes Zentrifugieren und dann die Fixation mit einer Mischung aus Eisessig und absolutem Methanol (1:3). Das Fixativ soll frisch hergestellt sein, da es Wasser absorbiert und damit an Wirkung einbüßt. SCHMID (1963) verwendet 50%ige Essigsäure (ebenfalls EVANS, 1965) und rät zu vorsichtiger Anwendung des Fixativs, um die Zellmembran nicht zu zerstören. Langsames Zufügen von Carnoy's Fixativ soll das, sowie das Klumpen der Chromosomen, verhindern (ROTHFELS und SIMINOVITCH, 1958; LEJEUNE, 1965). Nach einer Einwirkungszeit von 5 Minuten (ROTHFELS und SIMINOVITCH, 1958; EVANS, 1965), von mindestens 20 Minuten (SCHMID, 1963) bzw. 30 Minuten (MOORHEAD et al., 1960; FERGUSON-SMITH, 1964) soll wieder zentrifugiert und das Fixativ durch frisches ersetzt werden.

Entfernt werden die Fixativreste entweder durch rasche Lufttrocknung des Präparats über warmer Spiritusflamme (MOORHEAD, 1960 nach ROTHFELS und SIMINOVITCH, 1958) oder ohne zu zentrifugieren nach dem Abgießen mit Hilfe von Filter-

papier (SCHMID, 1963), anschließend wird dabei die Quetschmethode angewendet. EVANS (1965) empfiehlt für die Fixierung mit 50%iger Essigsäure langsames Trocknen (10-15 Minuten) auf einer Wärmeplatte. GAILLARD und SCHABERG (1964) bieten mit ihrer Sedimentationskammer einen ganzen "Apparat" zur Ausbreitung der Chromosomen an. Die Anwendung erfolgt direkt nach der hypotonischen Behandlung. Das Filterpapier soll vorher mit Hank's Lösung angefeuchtet werden.



Die Fixation der getrockneten Präparation wird sofort angeschlossen.

In jedem Fall färbt man darauf mit essigsaurem Orcein.

Erfolreich wurden nach den Prinzipien von MOORHEAD et al. (1960) Mikrokulturen teilweise mit weniger als 0,1ml Blut angefertigt (EDWARDS und YOUNG, 1961; EDWARDS, 1962; FRØLAND, 1962; CONNOLLY et al., 1964; EVANS,1965). Selbst Kulturen mit 5000-8000 Leukozyten /ml (CONNOLLY et al., 1964) gaben gute Ergebnisse. Vielleicht unterstützen Erythrozyten und andere Zellen, die nicht mitotisch aktiv werden und die bei den kleinen Mengen nicht vollständig abgetrennt werden können, die metabolische Versorgung (MELLMAN, 1965). Zur besseren Sedimentstion empfehlen EDWARDS und YOUNG (1961) die Verwendung von intravenöser Dextranlösung. Das anschließende Auswaschen soll vor der hypotonischen Behandlung mit 5%iger Saccharoselösung geschehen; sie soll das Medium zu-

rückhalten.

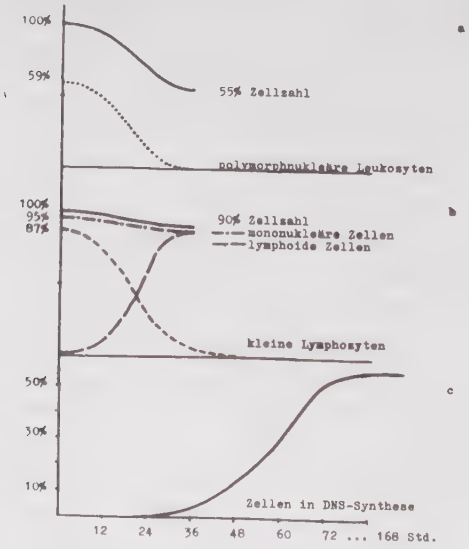
ARAKAKI und SPARKES (1963) führten eine Mikromethode mit 0,05ml Ganzblut ein. Die 4-6 Blutstropfen werden sofort in einen Behälter (eventuell heparinisierte Spritze) mit dem Kulturmedium gebracht, das 0,1ml PHA-M, 15ml Nährlösung (TC-199 oder Eagle's Medium), 5ml AB-Serum (LEJEUNE, 1965), AB-Serum und Hühnerserum (GROUCHY et al., 1964) oder 15%iges foetales Rinderserum (ARAKAKI und SPARKES, 1963) enthalten soll. EVANS (1965) hält normales Rinderserum für ebenso wirksam und CHAUDHURI (1966) verzichtet mit vollem Erfolg auf die Verwendung von zusätzlichem Serum oder Embryonalextrakt. Um die Agglutination der Erythrozyten zu verhindern, die in ihren Klumpen erwiesener Maßen einige mononukleäre Zellen enthalten, soll die Kultur besonders in den Anfangsstadien (zur Überwindung der agglutinierenden Wirkung von PHA-M) kräftig geschüttelt werden (CHAUDHURI, 1966) als auch durch die Verwendung von Essigsäure.

Mit dieser Methode können ohne Schwierigkeit nun auch von kleinen Kindern und Säuglingen, denen keine größere Menge Blut entnommen werden kann, Chromosomenanalysen gemacht werden.

Der einzige Nachteil der Kurzzeitkultur besteht in der Gefahr von Endoreduplikationen, die bei Kulturen von gesunden Menschen in 11% beobachtet wurden (POWSNER, 1966).

Lange Zeit wurde diskutiert, ob die großen Lymphozyten, die Monozyten oder unreife Zellen der Lymphozytenserie (NOWELL, 1960) mit PHA mitotische Aktivität entwickeln. MAC KINNEY et al. (1962) und CASTAIRS (1962; zit. nach MELLMAN, 1965) entschieden sich eigentlich mit schlagenden Beweisen für die kleinen Lymphozyten (siehe Skizze). LINDAHL-KIESSLING (1965) berichtet von einer Untersuchung, in der er die mitotische Aktivität von Lymphozyten aus Lymphe und Blut vergleicht. Er schreibt: "Unsere Ergebnisse unterstützen offensichtlich diese Erklärung (nämlich, daß sich die kleinen Lymphozyten in Lymphoblasten umwandeln, die

sofort in die Mitose eintreten) ... , die hohe mitotische Aktivität in Kulturen von Lymphe auf die überwiegende Zahl der kleinen Lymphozyten zu beziehen. ... Unsere Ergebnisse schließen die angeblich unentbehrliche Funktion der Granulozyten bei der mitotischen Stimulation aus. Granulozyten degenerieren schneller in PHA-Kulturen als in Blutkulturen ohne PHA. Tatsächlich wurden Mitosen nie beobachtet, bis eigentlich alle Granulozyten verschwunden waren." Auch die Glykogenabgabe der Granulozyten sei nicht entscheidend. Vielmehr sollte der Einfluß eher hemmend sein, da die Lymphozyten in der Lymphe früher reagieren als die Blutlymphozyten.



Graphische Darstellung zur Frage der Aktivität der mononukleären Zellen in der Blutkultur:
a) nach MacKINNEY et al. (1962)
b) modifiziert nach CASTAIRS (1962; cit. nach MELLMAN, 1965)
c) nach MacKINNEY et al. (1962)

Die Lebensdauer der Lymphozyten im Kulturmedium beträgt sogar bei Zimmertemperatur bis zu 4 Tagen (EDWARDS, 1963; ARAKAKI und SPARKES, 1963), so daß die Möglichkeit besteht, Blut auch aus größerer Entfernung in ein zytogenetisches Labor zu schicken. Ohne Medium sollen sie bei Zimmertemperatur keine 24 Stunden überleben, können aber bei 5°C bis zu 96 Stunden lebensfähig bleiben (MELLMAN, 1962). Dagegen schreibt BIRDWELL et al. (1965), daß eine heparinisierte Blutprobe bis zu 75 Stunden verschickt werden kann, und UCHIDA und RAY (1966), daß heparinisiertes, leukozytenhaltiges Plasma, das mit 0,1ml PHA und 2-3 Tropfen Erythrozyten versetzt wurde, bis zu 4 Tage ohne nachteilige Folgen transportiert werden kann.

Die Knochenmarkkultur geht auf FORD, JACOBS und LAJTHA (1958) zurück. Das Sternal- bzw. Iliakalpunktat von 1-2ml wird nach ihrer Kurzzeitmethode in eine heparinisierte Ringer-Lösung gegeben. Nach gewöhnlicher Sedimentation durch Gravität wird der Überstand verworfen und der Rest in einer Mischung aus Glukose-Salz-Lösung (0,6% Glukose, 0,7% NaCl) und menschlichem AB-Serum (oder Patientenserum) resuspendiert. In diesem Stadium kann die Kultur verschickt werden. Anschließende Inkubation von 5-15 Stunden. Nach 5 bzw. 7 Stunden (SANDBERG et al., 1960) sollen 0,2-0,4ml einer 0,04%-igen Kolchizinlösung zugefügt werden. Es folgt eine kurze Behandlung mit erwärmter, hypotoner Zitratlösung (0,37% Na-Zitrat, besser als NaCl), Fixieren und Quetschen der Präparate.

Als eine Variante wird das Quetschen von ungefärbten Zellen, die in 45%iger Essigsäure fixiert wurden, vorgeschlagen. Das Deckglas entfernt man durch kurzes Einfrieren (CONGER und FAIRCHILD, 1953). Die Färbung erfolgt mit essigsaurem Orcein. Damit soll der härtende Effekt des Orcein vermieden werden.

Eine andere Methode ist die von BÖÖK, FRACCARO und

LINDSTEN (1959). Das heparinisierte Knochenmarkpunktat wird in ein silikonisiertes Röhrchen gegeben, das 3ml heparinisiertes Kulturmedium (40% menschliches Serum, 30% TC-199, 30% Hank's Lösung, 5ml Rinderembryonalextrakt / 100ml Medium, Penicillin, Streptomycin) enthält. In dieser Form könne die Biopsie bei 4°C bis zu 48 Stunden aufbewahrt werden. 1ml dieser Suspension gibt man mit 2ml frischem Medium in eine sterile Petrischale, die ein Deckglas enthält. Nach zwei- bis dreitägiger Inkubation in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO_2 wird das Deckglas entnommen, für 10 Minuten bei Zimmertemperatur einer hypotonen Behandlung (0,7%ige vorgewärmte Na-Zitrat-Lösung) unterzogen und mit einer Farb-Fixierlösung behandelt (2%iges "natural orcein" in 50-60%igem Eisessig). Es folgt vorsichtiges Quetschen. Sowohl mit den Zellen auf dem Boden der Petrischale als auch mit dem Deckglas können Subkulturen hergestellt werden. Um eine große Anzahl von Mitosen zu erhalten, wird empfohlen, das Medium 12-18 Stunden vor Beginn der Präparation zu wechseln.

Eine Modifikation dieser Methode verwendet LEJEUNE (1965). Er bringt ein oder zwei Tropfen heparinisiertes Knochenmark direkt auf ein Deckglas, das mit einem Film Hühnerplasma überzogen ist, koaguliert in diesem Moment das Hühnerplasma mit einem Tropfen Embryonalextrakt und fixiert damit das Material auf dem Deckglas. Das Präparat wird in Kulturmedium gegeben und für 3-5 Tage hermetisch verschlossen inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgt entsprechend der Gewebekultur (s.u.). Die Verwendung von Kolchizin wird freigestellt.

Eine direkte Methode empfehlen KIOSSOGLOU et al. (1964) und sehr ähnlich auch TJIO und WHANG (1965). Das heparinisierte Material wird für 5 Minuten bei 300 U/min. zentrifugiert, das überstehende Plasma mit 0,1%iger Kolchizinlösung versetzt und nochmals zentrifugiert; der Überstand wird verworfen (KIOSSOGLOU et al., 1964). TJIO und WHANG (1965) geben das Material direkt in Kolchizinlösung (bei-

desmal für 1-2 Stunden), zentrifugieren für 4-5 Minuten bei 400 U/min. und verwerfen den Überstand. In beiden Fällen folgt die hypotonische Behandlung mit 2-3ml Na-Zitrat (1%ige Lösung) für 1/2 Stunde (TJIO und WHANG) oder Inkubation für 10 Minuten (KIOSSOGLOU). Die anschließende Fixation, Färbung, Lufttrocknung und Fertigstellung der Präparate entspricht den gängigen Techniken. TJIO und WHANG (1965) beschreiben noch eine zweite, ähnliche Methode ohne Verwendung einer Zentrifuge mit anschließendem Quetschen, fügen aber hinzu, daß sie diese nur für Laboratorien mit äußerst begrenzten Möglichkeiten geeignet halten.

BOTTURA und FERRARI (1960) verwenden eine noch direktere Methode, indem sie zwei Stunden vor Entnahme des Knochenmarks 0,1mg Colcemid/kg Körpergewicht intravenös spritzen, das entnommene Material sofort in hypotoner Lösung suspendieren, filtern, färben und quetschen. Während längerer, klinischer und hämatologischer Beobachtung wurde keine Anomalie entdeckt, die eventuell einen toxischen Effekt der Colcemidinjektion vermuten lassen konnte. Es wird von guten Ergebnissen berichtet.

Ganz ohne Kolchizin stellt KAJII et al.(1966) seine Präparate her. Das aspirierte Knochenmark wird sofort in 5ml hypotone (0,8%) Na-Zitratlösung gegeben, der 0,1ml einer Streptokinaselösung zugeführt wurde, um störendes Fibrin aufzulösen. Nach einer kurzen Inkubation von 30 Minuten erfolgt die weitere Behandlung wie gewöhnlich, die Ausbreitung der Chromosomen geschieht durch Lufttrocknung.

Der Vorteil direkter Knochenmarkpräparationen besteht darin, daß Chromosomenveränderungen in vitro so gut wie ausgeschlossen sind. Besonders wichtig ist diese Methode vielleicht bei Knochenmark von Leukämiepatienten, das sich entsprechend dem selektiven Wachstum gewisser Zelltypen in einer Kultur sehr wenig repräsentativ entwickelt. Die Interpretation bereitet dann erhebliche Schwierigkeiten. "Mit ziemlicher Sicherheit darf angenommen werden, daß die Ergeb-

nisse dieser Präparationen (nämlich den direkten) die Situation in den Zellen des Knochenmarks zum Zeitpunkt der Abnahme repräsentieren" (TJIO und WHANG, 1965).

Auch Liquorzellen können untersucht werden (BAUGHAM und HIRSCH, 1963). Ca. 20ml sollen bei 2000 U/min. für 10 Minuten zentrifugiert werden. Die Resuspension der Zellen erfolgt im üblichen Medium.

3.) H a u t - u n d a n d e r e G e w e b e k u l t u r e n

Trotz der ständig verbesserten Methode der Blutkultur hat die Haut- bzw. Gewebekultur ihre Bedeutung nicht verloren. Sie findet ihre wohlbegründete Anwendung zur Bestätigung der Ergebnisse von Blutkulturen, zur Diagnose eines Mosaiks, zur Bestimmung des Karyotyps bei einer Blutkrankheit, z.B. der Leukämie, oder auch zur Bestimmung des Karyotyps bei Neugeborenen (als Ergänzung zur Blutmikromethode), bei Aborten und Leichen. Außerdem werden Fibroblastenlangzeitkulturen in zunehmendem Maße für experimentelle Forschungen, wie zytologische, biochemische und virologische Studien benötigt.

Die heute hauptsächlich verwendete Methode geht auf die Langzeitkultur von HARNDEN (1960) zurück.

Besonders bevorzugt für die Fibroblastenkulturen wird die Haut, sowohl wegen der Einfachheit ihrer Gewinnung als auch wegen der zytologischen Klarheit ihrer Fibroblasten. Die Hautoberfläche wird mit Alkohol, Äther oder ähnlichem desinfiziert, jod- und quecksilberhaltige Mittel sollen vermieden werden (HSU und KELLOG, 1960; EBERLE, 1966). HARNDEN und BRUNTON (1965) empfehlen ein Lokalanästhetikum, das keinerlei hemmenden Einfluß auf die Kultur haben soll, während LEJEUNE et al. (1960) sehr davor warnt. Entgehen kann man dieser Schwierigkeit , wenn man die "schmerzlose Hautbiopsie" nach EDWARDS (1960) anwendet. Eine kleine Hautfalte (1-2mm hoch) wird abgeklemmt. Nach 30 Sekunden, bzw. 2 Minuten (LEJEUNE, 1965) ist die Haut blaß und unempfindlich, so daß das Material mit einem Skalpell oder einer Rasierklinge leicht entfernt werden kann. Die entstandene Wunde wird mit einem Adstringens behandelt (oder "flame-shaped", EDWARDS, 1960). Nach 3 Minuten (Blutungszeit) kann die Klammer entfernt werden. Bei der Entfernung des Gewebsstücks muß darauf geachtet werden, daß man etwas Koriumgewebe mitnimmt (1mm dicke Haut genügt nach EDWARDS, 1960), weil nicht

die epithelialen Zellen sondern die fibroblastenartigen Zellen die Kultur bilden. Sie seien außerdem weniger anfälliggegen toxische Agentien als die epitheliale Variante und wachsen zudem in Säugetierserum (PUCK et al., 1958).

Das Biopsiematerial kann nun in Hank's Lösung, die mit Antibiotika versetzt ist (EBERLE, 1965), oder in Kulturmedium (HARNDEN, 1960) verschickt werden. Die Zeit bis zur Kultivierung kann bis zu 5 Tage betragen, soll aber möglichst 2 Tage nicht überschreiten (HARNDEN und BRUNTON, 1965). Zwar waren Gewebstückchen noch nach einer Aufbewahrung von 15 Monaten bei -90°C fähig auszukeimen (McKEE et al., 1966), es fiel jedoch eine hohe Tetraploidie und Endoreduplikationsrate auf.

Zur Kultivierung wird das Material zerkleinert (1/4-1mm^2) und in einem Koagulum aus Hühnerplasma (Plasma eines jungen Hahnes) und Hühnerembryonalextrakt (CEE), das zur Ernährung der Zellen beitragen soll (HARNDEN, 1960), eingeschlossen. Es werden 2-5ml Wachstumsmedium (CEE, TC-199, Serum) hinzugefügt. Bei der Primärkultur sollen darin wenigstens 20% Serum (besonders geeignet foetales Rinderserum) enthalten sein (HSU und KELLOG, 1960). In einer 5%igen CO_2 Atmosphäre wird bei 37°C inkubiert, bis genügendes Wachstum (nach 10-14 Tagen, HARNDEN, 1960) zu verzeichnen ist. Das Medium wird alle zwei Tage, bzw. ein- bis zweimal pro Woche gewechselt. HSU und KELLOG (1960) befestigen die Gewebsstückchen mit Hilfe von perforiertem, sterilisiertem Zellophanpapier am Boden des Behälters (nach EVANS und EARLE, 1947) und verwenden damit kein Hühnerplasma und kein CEE.

Für eine Subkultur werden die Zellen nach Entfernung des Mediums mit einer 0,2%igen Trypsinlösung versetzt und für 10-30 Minuten bei 37°C inkubiert (MAKINO und SASAKI, 1959; HSU und KELLOG, 1960; HARNDEN und BRUNTON, 1965). FRØLAND (1961) verwendet eine 0,01%ige Trypsinlösung (in Ca- und Mg-freier Salzlösung). Bei HARNDENs ursprünglicher Methode (1960) wird eine 0,05%ige sog.Trypsin-Versene-Mischung

für 20 Minuten ohne Inkubation mit Erfolg angewendet.*) Vor dem nun folgenden Zentrifugieren (bei 500-1000 U/min.) müssen HSU und KELLOG (1960) zuerst ihr Zellophan entfernen und die daran haftenden Zellen abwaschen. Die Zellen werden in neuem Wachstumsmedium resuspendiert (es sind nur noch 10% Serum nötig) und wieder wie üblich inkubiert. Auf diese Art können beliebig viele Tochterkulturen hergestellt werden.

Zur Anfertigung von Chromosomenpräparaten wird 20-22 Stunden nach Wechsel des Mediums oder Ansetzen einer Subkultur eine 0,005%ige Kolchizinlösung zugegeben und für weitere 2-4 Stunden bei 37°C inkubiert (HARNDEN und BRUNTON, 1965). Die Erfahrung zeigt, daß damit eine in dieser Zeit einsetzende Mitosewelle ausgenützt werden kann. TJIO und PUCK (1958) bestätigen das mit der Angabe, daß die Verdoppelungszeit von "Monolayer"-Kulturen 16-24 Stunden beträgt. Besser als mechanisches Kratzen soll eine anschließende Trypsinbehandlung das Loslösen der Zellen, zudem auch die Entfernung von extrazellulären Proteinen und toten Zellen, bewirken und damit den störenden Hintergrund, der vor allem bei der Verwendung des klassischen Koagulums entsteht, etwas vermindern (HSU und KELLOG, 1960). Danach wird zentrifugiert, das Zellsediment in vorgewärmter Hank's Lösung resuspendiert, wieder zentrifugiert und dann die übliche, hypotonische Behandlung, Fixation und Färbung angeschlossen. Die Ausbrei-

*)
Die verdünnte Trypsin-Versene-Lösung wird mit Hilfe von $Ca^{++}Mg^{++}$-freier Hanks-Lösung aus 3 Bestandteilen hergestellt:

a) Hanks-Lösung ohne $CaCl_2$ und $MgSO_4$
b) Difco Bacto Trypsin (1:250) als 1%ige Lösung in $Ca^{++}Mg^{++}$-freier Hanks-Lösung; der pH-Wert wird mit n1 NaOH auf ca. 7,4 eingestellt.
c) "Diamino-ethane-tetracetic" Säure ("disodium" Salz) als 1%ige Lösung

tung der Chromosomen erfolgt je nach Belieben durch Quetschung, meist aber durch Lufttrocknung.

ROBBINS und MARCUS (1964) entwickelten eine besondere Methode, um "synchronisierte Populationen" zu erhalten. Sie machten die Beobachtung, daß der Grad der Zell-Substrat-Bindung in Beziehung zu der umgebenden Ca^{++}-Konzentration steht. Die Zellen werden in einem Medium mit relativ geringem Ca^{++}-Gehalt kultiviert (substituiert durch NaCl), sodaß die Haftwirksamkeit noch gut gewährleistet ist. Ein kurzes Kippen des Glases zur Zeit der Kollektion läßt das Medium schnell über die Zellen fließen und löst die in die Mitose eintretenden Zellen ab, da sie während dieser Zeit ein nur sehr geringes Haftvermögen besitzen. Die dadurch erhaltene Zellsuspension wird durch feine Nylonmaschen gefiltert, um Interphaseklumpen und ähnliche Verunreinigungen zurückzuhalten. Der Rest der Kultur wird nicht in seinem Wachstum gestört.

Die beiden anderen Methoden unterscheiden sich hauptsächlich in der Anwendung von Trypsin.

Nach PUCK et al. (1958) und nach LEJEUNE (1965) wird das Material in einer Petrischale zerkleinert und anschließend mit $2cm^3$ einer 0,04%igen Trypsinlösung für 5 Minuten inkubiert (PUCK et al., 1958), bzw. mit einer 0,0025%igen Trypsinlösung 1-4 Stunden behandelt (LEJEUNE,1965). Nach mehrmaligem Zentrifugieren und Waschen werden die Zellen inkubiert und nach der herkömmlichen Methode weiterbehandelt. BERGLAN (1959) inkubiert seine mit Trypsin erhaltene Zellsuspension auf einem Objektträger, der mit einem Agarrand versehen wurde. BÖÖK et al. (1961) empfiehlt, das Material direkt in Medium zu zerkleinern. Das beschädige weniger die Zellen und verkürze (durch Weglassen der Trypsinbehandlung) die Latenzzeit bis zu den ersten Wachstumszeichen auf 14 Tage.

Das Wesentliche der dritten Methode besteht darin, daß die zerkleinerten Gewebsstückchen direkt auf einem Ob-

jektträger kultiviert werden, auf dem man sie mit Hilfe von Hühnerplasma und Embryonalextrakt befestigt (KLINGER und SCHWARZACHER, 1962; LEJEUNE, 1965). Sollen nur Chromosomenpräparate hergestellt werden, fügt man 16-20 Stunden vor der Kollektion CEE hinzu (LEJEUNE, 1965). Die Weiterbehandlung erfolgt nach den gewohnten Methoden. STAHL et al. (1964) kommt sogar ohne den hypotonischen Schock aus. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die Zellen auch bei der Fixierung und Färbung nicht von der Glasoberfläche gelöst werden müssen, auf der sie gewachsen sind. So besteht sogar die Möglichkeit, einzelne Zellen zu kultivieren (TJIO und PUCK, 1958). Sollen Subkulturen hergestellt werden, so verfährt man nach dem Verfahren von HARNDEN (1960 und 1965).

Die Problematik der Fibroblastenkultur besteht in der langen Kultivierung und in den eventuell dabei entstehenden, spontanen Chromosomenveränderungen. Aus diesem Grund empfiehlt LEJEUNE (1965), vom gleichen Individuum mehrere Kulturen anzulegen, um Vergleichsmöglichkeiten zu haben. Verschiedene Autoren (TJIO und PUCK, 1958; HSU und KELLOG, 1960) berichten zwar, daß während einer Periode von 5-6 Monaten die Chromosomenzahl und -morphologie konstant bleibt. Die Transformationen oder Änderungen der Zellinie seien in Wirklichkeit zelluläre Verunreinigungen. Nur bei Tumoren bestehe eine Gefahr im Benutzen von Gewebekulturen. Dagegen sei aber nach den Beobachtungen anderer Autoren (z.B. KLINGER und SCHWARZACHER, 1962; STAHL et al., 1964) die mit dem Alter der Kultur zunehmende Aneuploidie (COURT BROWN et al., 1966) und Abnahme des Sexchromatins nicht zu vernachlässigen. HARNDEN (1960) jedoch meint, daß das Auftreten von polyploiden Zellen, bzw. Endoreduplikationen, nicht das originale Chromosomenkomplement verschleiern könne. SCHNEDL (1964) schließlich findet im Verlauf von Fibroblastenkulturen innerhalb eines Zeitraums von 140 Tagen zumindest bezüglich des Sexchromatins keinen Anhalt für eine Veränderung der Struk-

tur und der Häufigkeit.

Diesen ganzen Schwierigkeiten entgehen BAKER und ATKIN (1963), indem sie lymphoides Gewebe verwenden, dessen Kulturzeit verglichen mit der Hautkultur relativ kurz ist. Etwa 1cm^3 Material wird von Nachbargewebe befreit und in möglichst kleine Stücke geschnitten, so daß eine Suspension von freien Zellen und kleinen Zellklumpen entsteht. Es wird mit Medium (0,2ml PHA/10ml enthaltend) verdünnt und für 68-72 Stunden inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgt entsprechend der Blutkultur.

4.) Chromosomenuntersuchung an menschlichen Keimzellen

Nachdem nun mit Hilfe von Blut- und Gewebekulturen die verschiedensten Chromosomenanomalien erforscht wurden, können weitere Fortschritte auf diesem Gebiet nur durch bessere Kenntnis des Verhaltens menschlicher Keimzellen, besonders der Meiose, erhalten werden, da in ihnen ja der Ursprung jeglicher Anomalie begründet liegt.

Gewisse Schwierigkeiten bereitet die Erforschung der Meiose weiblicher Keimzellen, bzw. der Oozyten. Diese sind schon in den letzten Wochen des vorgeburtlichen Lebens in die frühe, meiotische Prophase eingetreten. Eine Metaphasefigur der Reduktionsteilung kann aber nur am Tag der Ovulation von einem reifen Follikel erhalten werden. Das aus dem Follikel freigewordene Ei, das sich in der Tube befindet, bietet nur eine Aquationsteilung. Auf Grund der Schwierigkeit einer ovariellen Biopsie war es bisher nicht möglich, frisches Untersuchungsmaterial zu erhalten, sodaß die weibliche Reduktionsteilung noch zu erforschen bleibt.

Beim Mann dagegen erlaubt die stetige Aktivität der Spermatogenese, die Unschädlichkeit und relativ einfache Ausführung der Biopsie die Untersuchung frischen Materials wenige Augenblicke nach der Entnahme.

Zur Beobachtung der Metaphasefiguren, sowohl der Reduktionsteilung als auch der Aquationsteilung, erfolgt die übliche hypotonische Vorbehandlung. FORD (1961; zit. nach MITTWOCH, 1965) gibt das Biopsiematerial für 3 Minuten in hypotonische Lösung und zerreißt darin die Tubuli mit Nadel und Pinzette. 10-20mm^3 Testismaterial genüge normalerweise. OHNO (1965) dagegen gibt das gesamte Material in isotone Lösung und präpariert unter dem Mikroskop mindestens 2cm lange Tubuli. Beim Zerschneiden in sehr kurze Stücke besteht nämlich leicht die Gefahr, daß die Spermatozyten, die sich in den späten Meiosestadien lösen und zur Lumenmitte wandern, bei der hypotonen Vorbehandlung verloren gehen,

d.h. einfach weggespült werden. Um dies zu verhindern, wird also von OHNO (1965) ein langes Tubulusstück auf einen Objektträger gebracht, mit 2ml destilliertem Wasser bedeckt und für 30 Minuten der hypotonen Einwirkung ausgesetzt. GARDNER und PUNNETT (1964) verwenden 0,3%ige Na-Zitrat-Lösung für 1-6 Stunden. EVANS et al. (1964) dagegen suspendiert das Material in isotoner Na-Zitrat-Lösung, zentrifugiert, verwirft den Überstand und resuspendiert die sedimentierten Spermatozyten in hypotoner (1%) Na-Zitrat-Lösung (für 12 Minuten).

Darauf folgt die Fixation mit dem üblichen 3:1-Äthylalkohol-Eisessig-Gemisch (FORD, 1961; EVANS et al., 1964) oder mit 50%iger Essigsäure (OHNO, 1965). Anschließend wird das Gewebsstück, soweit noch nicht geschehen, in kleine Partikel geschnitten, gequetscht und nach Feulgen gefärbt (OHNO, 1965) oder auch erst gefärbt und dann gequetscht (FORD, 1961).

EVANS et al. (1964) läßt seine Zellsuspension lufttrocknen und färbt mit milchsaurem Orcein. Der Vorteil seiner Methode sei die Trennung der Zellklumpen in einzelne Zellen. Verglichen mit der Quetschtechnik erhalte man weniger Zellbruchstücke, und die Chromosomen seien besser ausgebreitet. Zudem würden sich mit seiner Methode auf einem Objektträger bis zu 200 Zellen für eine Analyse eignen, wogegen mit der Quetschmethode dafür 20 und mehr Präparate nötig seien.

GARDNER und PUNNETT (1964) gehen nach der hypotonischen Behandlung ganz eigene Wege. Mit einem besonderen Substrat (einer dreimolaren "glucono-delta-lactone"-Lösung) machen sie das Gewebe weich und sprengen damit gleichzeitig die Zellmembran, was zur besseren Trennung und Ausbreitung der Chromosomen beiträgt. Es folgt eine 10-12stündige Färbung mit Aceto- oder Propiono-Carmin (nicht zu ersetzen durch Orcein, das durch das anschließend verwendete Hoyer-Medium gebleicht wird), Fixieren und Zerschneiden des Gewebes, sodaß eine dick visköse Suspension entsteht. Sie wird durch

Gaze gefiltert, um Tubuli und anhaftendes Gewebe zurückzuhalten. Das Filtrat wird zentrifugiert, um die letzten Verunreinigungen zu entfernen und die freien Zellen (Spermatozyten) zu konzentrieren. Ein Tropfen dieser Zellsuspension wird auf einem silikonisierten Objektträger mit Hoyer's Medium gemischt. Man erwärmt die mit Deckglas versehene Präparation leicht, um die Zellen abzuflachen und auf dem Objektträger zu fixieren. Durch die Verwendung von Hoyer's Medium soll das nun folgende Quetschen und dauerhaftes Aufkleben in einem Schritt erfolgen.

Zum Studium der meiotischen Prophase (der Leptotän-, Zygotän-, Pachytän und Diplotän-Figuren) soll unter allen Umständen hypotonische Behandlung vermieden werden. Zur Vorbehandlung genügt eine 10minütige Aufbewahrung in isotoner Salzlösung bei 3°C. Die meiotische Prophase von Oozyten kann am besten und zahlreichsten an Ovarien von 4-8monatigen Feten beobachtet werden. Das Follikelepithel wird durch eine Inkubation von 30 Minuten bei 37°C in einer 10%igen Trypsinlösung entfernt.

Zu den Ergebnissen der Chromosomenuntersuchung an menschlichen Keimzellen seien nur wenige Bemerkungen gemacht und im übrigen auf die ausführliche Untersuchung und Beschreibung von EBERLE (1966) hingewiesen. McILREE et al. (1966) hält es für möglich, daß Männer mit Strukturneuordnungen, die ein oder mehrere Chromosomen betreffen, ungewöhnlich häufig unter denen gefunden werden, die nicht fruchtbar sind. Es sei wahrscheinlich, daß unter diesen Männer mit scheinbar normalen somatischen Chromosomen sein werden. Wegen der ungewöhnlichen Konfigurationen, die dem Paaren von homologem Material folgt, könnten nur in meiotischen Chromosomen solche parazentrischen und perizentrischen Inversionen, sowie reziproken Translokationen entdeckt werden. Es sei als wünschenswert, bei infertilen Männern mitotische und meiotische Chromosomen zu prüfen.

Ein weiteres Problem stellt die "non-disjunction" als

Ursache für die Syndrome mit gonosomalen Aberrationen (Ullrich-Turner- und Klinefelter-Syndrom) dar, wofür beim Menschen noch kein formeller, zytologischer Beweis erbracht werden konnte. (Nur klinisch mit Hilfe von rezessiver Protanopie und Deuteranopie und ähnlichen geschlechtsgebundenen Anomalien konnte er geliefert werden) OHNO (1965) hält zytologische Methoden, d.h. die Beobachtung von Äquationsteilungen, für nicht geeignet, jemals eine Aussage über die Häufigkeit von "non-disjunction" zu machen, da das ausgewertete Material viel zu gering sei.

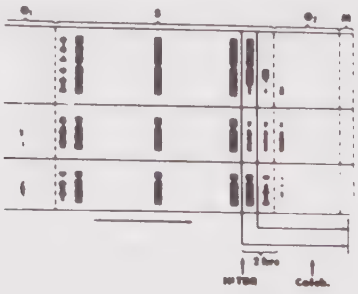
5.) Autoradiographie menschlicher Chromosomen

Autoradiographie ist eine photographische Methode, um radioaktive Einschlüsse im Objekt zu lokalisieren und zu messen. Mittels besonders synthetisierter Moleküle werden radioaktive Isotope (H^3, C^{14}, P^{32}, S^{35} usw.) ... eingeführt (DARLINGTON und LACOUR, 1962). TAYLOR et al. (1957) führte diese Methode in die Chromosomenforschung ein. Die besondere Schwierigkeit bestand darin, ein Markierungsmittel zu finden, dessen Strahlung im Größenbereich der Chromosomen liegt, um einzelne Chromosomen darstellen zu können. Die Beta-Strahlung der meisten Isotopen ist relativ groß. Nur Tritium sendet Elektronen mit einer geringen Maximalenergie aus, sodaß hier die Reichweite der Beta-Strahlung maximal nur 3µ, im Mittel sogar nur 1,5µ beträgt. Außerdem finden sich als Halbwertzeit 12,3 Jahre (SCHMID, 1965). Damit ist auch bei längerer Behandlungs- und Expositionsdauer (auch Aufbewahrung der Präparate) kein Energieabfall zu befürchten, d.h. zusätzlich zu berücksichtigen. Als zweites ist die Generationszeit von Wichtigkeit, deren Dauer nach SCHMID (1965) weniger als 24 Stunden, nach MOORHEAD und DEFFENDI (1963) sowie ATKINS und SANTESSON (1966) bei Fibroblastenlangzeitkulturen 18 Stunden beträgt, und als drittes die Periode der DNS-Synthese (=S-Periode), nach MOORHEAD und DEFFENDI (1963) 7-7,5 Stunden. Wesentlicher jedoch für die Markierung ist die Zeit zwischen der DNS-Synthese und der Mitose ($=G_2$-Periode) mit einer mittleren Dauer von 4-6 Stunden (SCHMID, 1965).

Um nun durch das Markierungsmuster, das mit Hilfe von H^3-Thymidin während der DNS-Synthese entsteht, morphologisch vorher nicht unterscheidbare Chromosomen zu charakterisieren und damit einer exakten Identifikation zugänglich zu machen, gibt es zwei Methoden: 1) "Pulse-Labeling"
2) "Contiuous Labeling".

Bei der ersten, herkömmlicheren Methode des sog. "Pulse-Labeling" (ATKINS et al., 1963; A. BISHOP und O.N. BISHOP, 1963; MOORHEAD, 1963) erfolgt die Markierung mit radioaktivem Thymidin (im allgemeinen: Konzentration 1µc/ml Medium; spezifische Aktivität zwischen 1,41 und 2c/mM) nur während einer kurzen Zeitdauer, die zwischen 10 und 20 Minuten schwankt. Während dieser Zeit wird bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Isotopenmedium entfernt und durch frisches Medium ersetzt, das nicht markiertes Thymidin im Überschuß enthalten soll. Es folgt eine Reinkubation von 4-12 Stunden. SCHMID (1965) warnt vor diesem übermäßigen Thymidinzusatz, da solche hohen Konzentrationen die DNS-Synthese in gewissem Umfang hemmen und damit die S-Periode erheblich verlängern können. Damit erhöht sich die Asynchronie zwischen den einzelnen Zellen, und es werden nach einer bestimmten Zeit weniger Zellen das Metaphasestadium erreicht haben. Außerdem empfiehlt SCHMID (1965) für diese Methode "Monolayer"-Kulturen, da bei diesen das Waschen der Zellen und der Wechsel des Mediums einfacher vorgenommen und damit ein Temperaturschock leichter vermieden werden kann. LIMA-DE-FARIA et al. (1961) verwendet nach Zentrifugieren und zweimaligem Waschen in TC-199 Kulturmedium ohne Thymidin.

Die Methode des sog. "Continuous Labeling" beruht auf der Beobachtung, daß die Chromosomen am Ende der S-Periode (in den letzten 2 Stunden) ein ganz spezifisches Muster zeigen. Damit werden nur die spät DNS-synthetisierenden Stellen markiert und erleichtern die Auswertung, wogegen während des größten Teils der S-Periode DNS an so vielen Stellen synthetisiert wird, daß mit Hilfe der Autoradiographie Einzelheiten kaum zu erkennen sind.



Aus diesem Grund wird 6 Stunden vor Beendigung der Kultur H^3-Thymidin (H^3TDR) in einer Konzentration von 1µc/ml Medium (spezifische Aktivität 1,9c/mM) zugefügt. Es muß nicht gesondert wieder aus der Kultur entfernt werden, da es von den Chromosomen nur während der DNS-Synthese verwendet und nur in so geringer Menge im Zytoplasma gespeichert wird, daß kein störender Hintergrund entsteht. Die Entfernung von überschüssigem Thymidin erfolgt zwangsläufig bei der üblichen Herstellung der Präparate. Chromosomenfrakturen auf Grund des Strahleneffekts bleiben nach SCHMID (1965) bei der verwendeten Konzentration in erträglichen Grenzen. GEY (1966) jedoch findet speziell bei der "Continuous Labeling " Methode eine einwandfreie Korrelation zwischen Markierung und Bruchstelle. Nach seinen Beobachtungen erscheinen bei dieser Methode 1,6 Chromatidaberrationen pro Zelle, während sie spontan in unbehandelten Kulturen nur 2-3mal/100 Zellen auftreten sollen.

Zur Anhäufung von Metaphasen wird 2 Stunden vor Beenden der Kultur Colcemid (Endkonzentration 0,03µg/ml) zugefügt. Die Herstellung der Präparate erfolgt nach den üblichen Methoden. Sowohl die Lufttrocknungstechnik, als auch die Quetschmethode ist geeignet. Ein störender Hintergrund kann vermieden werden, wenn man die Präparate in 5%ige eisgekühlte Trichloressigsäure taucht oder zumindest vor Aufbringen der Emulsion sorgfältig mit destilliertem Wasser spült (DARLINGTON und LACOUR, 1962). EVANS (1965) verwendet eisgekühlte Essigsäure, um die Präparate frei von zytoplasmatischen Verunreinigungen zu machen. Die Färbung erfolgt zum Teil vor dem autoradiographischen Verfahren mit den gewohnten Mitteln, zum Teil nach der photographischen Entwicklung, wobei zu beachten ist, daß sich die Gelatine des Films nicht anfärbt, was die Klarheit der Färbung beeinträchtigt. MOORHEAD und DEFFENDI (1963) sowie SCHMID (1965) empfehlen besonders verdünnte Giemsa-Lösung. Die Aufbewahrung der Präparate ist im Eisschrank bei 4°C für mindestens

vier Wochen möglich.

Als autoradiographisches Verfahren empfehlen die meisten Autoren nicht die Verwendung einer flüssigen Emulsion, deren Auftragen in gleichmäßiger Dicke gewisse Schwierigkeiten bereitet, und die nur zwei Monate lang aufbewahrt werden kann, sondern die sog."stripping film" Technik, die sehr gute Ergebnisse von gleichbleibender Qualität liefert. Nach Eintauchen des Films in zunächst 75%igen und dann absoluten Alkohol wird ein 40×40mm großes Filmquadrat mit der Emulsionsseite nach unten in destilliertes Wasser (bei Zimmertemperatur) gebracht. Der Film breitet sich auf der Oberfläche aus, wird mit dem Objektträger (Präparat nach oben) unterfangen und aus dem Wasser gehoben. Die überstehenden Enden des Films werden auf die Rückseite umgeschlagen. Nach dem Trocknen erfolgt die Exposition in einem hermetisch verschließbaren Behälter, um störenden Lichteinfluß zu vermeiden, und mit einem dehydrierendem Agens ($CaSO_4$) bei 4°C. Die Angaben über die Expositionsdauer schwanken bei den einzelnen Autoren zwischen 5 und 20 Tagen. Vor dem Entwickeln wird der Film vorsichtshalber festgeklebt (z.B. mit Permount) und danach sollen die umgeschlagenen Enden mit dem Rasiermesser entfernt werden. Die Präparate werden mit Deckgläsern versehen und in Euparal eingeschlossen.

Eine besonders scharfe Beobachtungsmöglichkeit erhält EVANS (1965) mit seiner "inverted method", indem er das Präparat anstatt auf einen Objektträger auf ein Deckglas klebt und den Objektträger an unterster Stelle zum Abdecken des autoradiographischen Präparats benützt. Auf diese Art und Weise liegt der Film nicht störend zwischen Zellen und Objektiv.

Falls es in seltenen Fällen einmal nötig sein sollte, den autoradiographischen Film zu entfernen, um Kontrollaufnahmen der Chromosomen zu machen, so ist das ohne Beschädigung der Chromosomen möglich. Eine genaue Beschreibung der Methode gibt SCHMID (1965). Im allgemeinen jedoch ist es bequemer und ratsamer, Kontrollphotographien vor der Anwendung des Films zu machen.

Zum Schutz während der autoradiographischen Behandlung überziehen A. BISHOP und O.N. BISHOP (1963) das Präparat mit einem Kunstharzfilm ("Vinalak"). Da er sich nicht mit Wasser mischt, kann er als Tropfen auf eine Wasseroberfläche gegeben werden und wird ähnlich der "stripping film" Technik mit dem Präparat unterfangen und auf dem Objektträger gebracht. Der besondere Vorteil dieser Methode besteht darin, daß der Film ohne Beschädigung der Chromosomen leicht entfernt und durch einen neuen ersetzt werden kann. Eine mehrmalige Exposition bietet also keinerlei Probleme. Ein zweiter Vorteil ist, daß durch diesen Lack die Farbe des bereits gefärbten Präparates weder den Film angreift, noch durch die verschiedenen Prozesse selbst angegriffen werden kann, wie das z.B. bei der Färbung mit Orcein der Fall ist.

Zum Problem der Asynchronie homologer Chromosomen, die besonders bei der Anwendung des "pulse-labeling" Verfahrens beobachtet wurde, sei hier nur erwähnt, daß bei der "continous labeling" Methode, d.h. bei längerer Einwirkungsdauer der markierenden Substanzen, im allgemeinen homologe Synchronie beobachtet wurde (SCHMID, 1963; GERMAN, 1964). Vermutlich besteht die Erklärung darin, daß eine sehr geringgradige Asynchronie homologer Chromosomen vorhanden ist, die besonders bei kurzdauernder Markierung zum Ausdruck kommt (GERMAN, 1964). Endgültig ist diese Diskussion aber noch nicht abgeschlossen. ATKINS und SANTESSON (1966) sprechen sich für die Asynchronie, GILBERT et al. (1966) für die Synchronie homologer Chromosomen aus.

Auch das RNS-Synthese-Muster wurde autoradiographisch

mit H^3-Uridin untersucht (COMINGS, 1966). Mit Ausnahme des inaktiven X-Chromosoms konnte gegen Ende der Prophase eine Abnahme und in der Metaphase ein völliges Sistieren der RNS-Synthese beobachtet werden. Als Ergebnis fand sich jedoch keine spezifische, lokalisierte Markierung der Metaphasechromosomen.

Die Autoradiographie ist inzwischen eines der wichtigsten Hilfsmittel der Chromosomenforschung geworden. Bei der Analyse von X-Anomalien, bei der Differenzierung einzelner Chromosomen, besonders bei Trisomien, und nicht zuletzt bei der Aufklärung von Translokationen auf Grund des unveränderten Syntheserhythmus der Chromosomenbruchstücke, ist diese Methode aus der Zytogenetik nicht mehr wegzudenken.

6.) Mikroskopisch-photographische Technik

Zum Lichtmikroskop, dessen Auflösungsvermögen und Vergrößerung für Chromosomenuntersuchungen völlig ausreicht, sind im Rahmen dieser Darstellung nur einige Bemerkungen zu machen. Ein wesentlicher Punkt des Mikroskopierens besteht darin, daß die künstliche Beleuchtung ein genau gleichbleibendes, auf das Objekt fokussiertes Bild der Lichtquelle erzeugt.

Um von den so betrachteten Präparaten gute Mikrophotographien herzustellen, sollen die Fixierungsmittel so ausgewählt werden, daß sie die Herstellung dünner Ausstriche und Quetschpräparate erlauben. Zur Verwendung einer kräftigen Färbung wird geraten. Ein schwaches Objektiv mit einer größeren Schärfentiefe sei vorzuziehen. Die endgültige Vergrößerung ergibt sich als 3500 bis 4000fach. Die besten Kontraste erreiche man mit Kunstlicht, Fremdlicht soll möglichst abgeschirmt werden.

Das Phasenkontrastmikroskop wird zur Beobachtung von lebenden Zellen und ihrer Mitosen in Gewebekulturen verwendet (RUNGE, 1965), zur einfachen und schnellen Sexchromatinuntersuchung (DÖMÖTRI, 1964; MURO, 1966) und zur Intensivierung blasser Chromosomenfärbungen (MELLMAN, 1965). Zu beachten ist jedoch, daß der DNS-Gehalt, d.h. die unterschiedliche optische Dichte der Chromosomen, mit diesem Verfahren nicht erfaßt werden kann.

Die elektronenmikroskopische Betrachtung ist auf dem Gebiet der Chromosomenforschung nicht sehr ergiebig. Die Vorbereitung des Materials erfordert ein Nachfixieren mit OsO_4, es folgt eine Behandlung mit Uranylazetat. WOLSTENHOLME (1965) bettet anschließend das Präparat in einen Plastikblock ein und fertigt für die Elektronenmikroskopie dünne Schnitte davon an. Die Beobachtung des Sexchromatins ergibt Fasern, Stäbchen und zirkuläre Komponenten von ca. 200Å im Durchmesser.

7.) Identifikation der Chromosomen

Schon 1960 schreibt PATAU zu diesem größten Problem der Chromosomenforschung: "Mit der kürzlichen Entdeckung, daß verschiedene Anomalien beim Menschen durch spezifische Anomalien des Chromosomensatzes verursacht sind, wurde die zuverlässige Identifikation von individuellen Chromosomen eine Sache von beträchtlichem genetischen und vielleicht medizinischen Interesse."

Meistens werden wohl auch heute noch nach den Prinzipien der DENVER-Nomenklatur die Chromosomen paarweise geordnet. Zur objektiven Dokumentation wird aus diesem Grund zunächst bei guter Beleuchtung und mit Hilfe eines Lichtmikroskops eine Photographie der ausgewählten Zellen angefertigt, deren Chromosomen sich nicht überschneiden sollen. Unter Verwendung der "pairing-off"-Methode, bei der die aus der Photographie ausgeschnittenen Chromosomen der Größe und der Lage des Zentromers nach zu Paaren zusammengefaßt werden, erhält man das gewünschte Karyogramm. Außer Acht gelassen werden dabei verschiedene technische Mängel dieser Methode, die leicht eine falsche Identifikation einiger weniger gut definierten Chromosomen nach sich ziehen können, ganz abgesehen davon, daß die Längendifferenz zwischen homologen Chromosomen sogar etwas mehr als 5% betragen kann.

Zunächst einmal kann die Photographie zu einigen falschen Interpretationen führen. Als erstes wäre dabei die zweidimensionale Aufnahme dreidimensionaler Objekte zu nennen. Bei einer Photographie läßt sich die Dicke bzw. Kontraktion der Chromosomen nicht mehr zuverlässig erkennen. Außerdem ist es unmöglich festzustellen, ob die Enden aus der Hauptebene in einer Richtung herausragen. Sie erscheinen verzerrt und damit verkürzt. Eine ähnliche Verzerrung erleidet das gesamte Chromosomenkomplement durch den unterschiedlichen Abstand von der optischen Achse. Eine zweite Schwierigkeit besteht in der Beurteilung der Färbeintensität, da die in der Photographie stärker erscheinenden Kontraste eine über-

triebene Chromosomenkontraktion vortäuschen können. Nicht zuletzt ist es möglich, durch eine kontrastreiche Aufnahmetechnik die Chromosomenkonturen sowohl in der Länge als auch in der Breite künstlich zu verändern. Ähnliche Effekte ergeben sich unter Umständen durch die Beleuchtung.

Dem Auge des erfahrenen Zytologen bleibt es überlassen, beim Mikroskopieren all diese Einzelheiten richtig zu interpretieren, einschließlich der Farbdichte, die bei der Färbung nach Feulgen genau dem DNS-Gehalt bzw. der Kontraktion der Chromosomen entspricht, während sie mit Orcein nicht spezifisch ist, da mit dieser Methode keine absolute Einheitlichkeit der Färbung erreicht werden kann.

Zur Verbesserung der objektiven Methodik wurde die statistische und graphische Auswertung der Längenmessung eingeführt, obwohl dabei zu den schon oben genannten Schwierigkeiten noch einige weitere hinzukommen. Auch wenn man nur die relative Chromosomenlänge (bezogen auf die Länge des halben Chromosomensatzes 22A + X), die Lage des Zentromers (ausgedrückt durch die Länge des kurzen Arms dividiert durch die Länge des langen Arms) und den Zentromerindex (aus Länge des kurzen Arms dividiert durch die totale Länge des Chromosoms) verwendet, so bleibt trotzdem das Problem der Messung bestehen. Voraussetzung für diese Methode wäre eine in allen Präparaten konstante, gleichmäßige Kontraktion aller Chromosomen. Unübersehbar aber ist, daß der Grad der Chromatinkondensation entsprechend der Dauer der Kolchizinbehandlung variiert, daß innerhalb einer Metaphasenplatte die längeren Chromosomen die Tendenz zeigen, sich unter Kolchizineinfluß mehr zu kontrahieren als die kürzeren, und daß die Zentromere medianer erscheinen (SASAKI, 1961).

Abgesehen davon ist es fast unmöglich, auf Grund der unscharfen Begrenzung der Chromosomen und der relativ großen, achromatischen Zentromerregion auch nur einigermaßen exakte Messungen durchzuführen. Trotz dieser Bedenken, die besonders PATAU (1960 und 1965) geäußert hat, hält LEJEUNE

(1965) diese Methode, die ja nur relative Werte verwendet, für nicht ungeeignet, einzelne, schwer definierbare Chromosomen zu identifizieren. EBERLE (1966) meint dazu: "Mit rechnerischen Methoden kann man also, entgegen der Ansicht, welche man beim Studium des DENVER-Reports gewinnt, keine Identifikation betreiben. Dennoch sind die relative Länge und die Lage der Insertionsstellen, wenn sie als relativer Maßstab verwendet werden, ein geeignetes Mittel zur Seriierung der mitotischen Chromosomen."

Um eine möglichst exakte Längenmessung zu erhalten und um gleichzeitig die Analyse zu vereinfachen, wurde versucht, hierbei Hilfsmittel wie Photometer und Computer einzusetzen. Zur Anwendung des Photometers muß die Färbung mit Gallocyanin-Chrom-Alaun erfolgen - laut SANDRITTER (1963; zit. nach MENDELSOHN et al., 1966) ein histochemisches Reagenz für DNS. Die Messungen stimmen genau mit den übrigen Längenmessungen überein. Noch werden mit dem Computer ca. 4% der Chromosomen falsch klassifiziert. Doch meist gehören sie zu den Gruppen, deren morphologischen Unterschiede sehr gering sind und die auch dem Zytologen Schwierigkeiten bereiten. Trotzdem nimmt GILBERT (1966) auf Grund der relativ guten Übereinstimmung der Karyogramme an, "daß die Automation der Längenanalyse von Chromosomen ein nützliches Hilfsmittel für den Zytologen sein wird."

Geeignete Erkennungsmerkmale für einige akrozentrische Chromosomen erschienen zunächst die Satelliten an den kurzen Armen zu sein, bis sich herausstellte, daß alle akrozentrischen Chromosomen Satelliten haben können, daß sie teilweise sehr klein sind und nur in den allerbesten Präparationen erkannt werden können, und daß sich die Satelliten homologer Chromosomen in der Größe teilweise sehr unterscheiden.

Als echte Merkmale jedoch sind die sekundären Einschnürungen bzw. die sehr schwach angefärbten Regionen der Chromosomen 1, C', 16 und Y anzusehen, die völlig unabhängig

von SAKSELA und MOORHEAD (1962) und von SASAKI und MAKINO (1963) auf Grund verschiedener Methoden zuerst beobachtet wurden. SAKSELA und MOORHEAD (1962) fanden sie besonders häufig beim Trocknen und Ausbreiten der Chromosomenpräparationen mit Hilfe der "Flammen-Technik", während SASAKI und MAKINO (1963) mit Ca-freiem Medium ähnliche Ergebnisse zu verzeichnen hatten. FERGUSON-SMITH et al. (1962) erwähnt, daß kein Anhalt dafür besteht, daß eine Aufbewahrung im Kühlschrank die Erscheinung sekundärer Einschnürungen beeinflußt.

Eine sehr objektive Identifikationsmöglichkeit ist in der Autoradiographie gegeben, mit deren Hilfe bisher leider nur die Chromosomen Nr. 4 und 5, D_1 und natürlich das heteropyknotische X sicher beschrieben werden konnte.

Als Richtlinie zur Identifizierung von Chromosomen ohne spezifische Markierung wird empfohlen, mehrere, möglichst gut präparierte Zellen zu untersuchen und auf Grund der Armlängen und des Kontraktionsgrades zu beurteilen. Bei der Wahl früher Metaphasen sollen nach GILBERT et al. (1962) die kleinen Chromosomen besser zu erkennen sein, was die alte Beobachtung bestätige, daß sich die kurzen Chromosomen früher kontrahieren als die langen.

EBERLE (1966) empfiehlt das Pachytän der Meiose für individuelle Strukturstudien. Der Aussagewert meiotischer Chromosomenanalysen sei wesentlich höher als jener von mitotischen. Die meiotischen Chromosomen seien nicht nur vielseitiger gegliedert (Eu- und Heterochromatin seien in der mitotischen Metaphase nicht mit Sicherheit zu unterscheiden), sondern auch 3- bis 6mal länger als die mitotischen.

IV DIE BEDEUTUNG DER CHROMOSOMENANALYSE IM RAHMEN DER KLINISCHEN DIAGNOSTIK

Seit der Entdeckung der G_1-Trisomie als Ursache für den Mongolismus (LEJEUNE , GAUTIER und TURPIN, 1959) und der Fehlverteilung von Geschlechtschromosomen als Ursache für das Klinefelter- (JACOBS und STRONG, 1959) und das Turner-Syndrom (FORD, JONES et al., 1959) konnte die Chromosomenanalyse, die bisher noch ein gewisses Schattendasein innerhalb der klinischen Fachgebiete führte, bei verschiedenen Krankheitsbildern und Anomalien wertvolle diagnostische Hinweise liefern, die zum Teil rückwirkend wieder zur Erforschung der Chromosomenmorphologie beitrugen.

Besonders weit fortgeschritten ist der Versuch bei Chromosom 18, eine vorläufige"Karte" anzulegen (DE GROUCHY, 1965; zit. nach LENZ, 1967). Beim Ausfall des kurzen Arms wurde Syndaktylie, ein abnorme Stellung des axialen Hautleistentriradius der Handfläche und Hypertelorismus beobachtet und bei Verlust des langen Arms von distal nach proximal Wirbelmuster auf den meisten Fingern, eine Gehörgangsatresie und Vierfingerfurche. Bemerkenswert ist vielleicht auch die mögliche Beziehung zwischen Herzfehlern und Deletion eines Chromosoms des Paares Nr. 16 (NAKINO, 1962; zit. nach LENZ, 1967), was aber nicht sicher bewiesen werden konnte.

In vielen Fällen von Schwachsinn, meist verbunden mit diversen angeborenen Mißbildungen oder sog. Degenerationszeichen, wie zusammengewachsenen Augenbrauen, Epikanthus, kurzer Nase mit eingesunkener Wurzel, tiefstehenden Ohren, Klumpfuß, Minderwuchs, hypertonischer Muskulatur, Pylorusstenose und Krämpfen, um nur einige Merkmale herauszugreifen, wurden die verschiedensten Chromosomenanomalien beobachtet. Es fanden sich zusätzliche, abnorme, nicht identifizierbare Chromosomen, zusätzliche Chromosomenfragmente, Deletionen, aber auch Trisomien (D, E, G), nicht balanzierte Translokationen, zentrische Fusionen, perizentrische

Inversionen und die unterschiedlichsten Mosaikkombinationen. Die Häufigkeit von Chromosomenanomalien bei Schwachsinn mit morphologischen Anomalien wird, wie folgt, angegeben: 50 Kinder, davon 4 mit abnormem Karyotyp; und zwar:

(SUMMITT und PATAU, 1964; zit. nach LENZ, 1967)

1 mit Trisomie 18
1 mit G-Trisomie als Mosaik
1 mit Deletion des langen Arms von Nr. 18
1 mit Translokation Nr. 13

Es gibt unzählige Fallberichte. Daraus seien nur ganz wenige herausgegriffen, die trotz verhältnismäßig geringer Mißbildungen und teilweise ohne Schwachsinn deutliche Chromosomenanomalien aufweisen (zit. nach LENZ, 1967). So ergab sich z.B. bei einer isolierten Gaumenspalte eine D-Trisomie und bei einer Armmißbildung, die den leichteren Fällen von Thalidomid-Embryopathien nicht unähnlich war, eine E-Trisomie. Die G_2-Trisomie zeichnet sich im Gegensatz zur G_1-Trisomie (Mongolismus) durch Schwachsinn ohne mongoloide Zeichen aus. Ein familiäres Mosaik wurde bei einer Lippenfistel mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte (normal/Trisomie 4-5) beobachtet und bei Hämaturie mit zum Teil chronischer Nephritis (normal/15% Trisomie 19-20).

Es ist erstaunlich, daß Trisomien nur bei ganz bestimmten Chromosomen bzw. Chromosomengruppen beobachtet wurden. Autoradiographische Untersuchungen zeigten, daß gerade diejenigen Chromosomen zu Trisomie neigen, die besonders spät die DNS-Replikation vollziehen und wie das spät replizierende X-Chromosom bevorzugt peripher liegen. "Die spät replizierenden, heterochromatinhaltigen Chromosomen prädisponieren vermutlich einerseits zur Non-Disjunction, andererseits ist ihr trisomer Zustand infolge der genetischen Inaktivierung eher mit Leben und Entwicklung vereinbar" (LENZ, 1967). Auch die partielle Monosomie bei Nr. 5 ("Cri-du-chat"-Syndrom) betrifft einen spät replizierenden Abschnitt. Bei den großen Chromosomen nimmt man an, daß während der meiotischen

Paarung leichter ein Segmentaustausch stattfindet, der die Non-Disjunction verhindert. Tritt sie aber ein, so wirkt sich die Trisomie bei größeren Chromosomen wahrscheinlich letal aus.

Ein weiteres großes Gebiet der Zytogenetik besteht darin, Aborte und Infertilität auf ihre Ursachen hin zu erforschen. In großen Untersuchungen, wie sie z.B. CARR (1965) durchführte, ergaben sich von 200 Aborten 44 mit abnormem Karyotyp bei einem durchschnittlichen Alter der Mutter von 31 Jahren. Nach anderen Untersuchungen (u.a. CARR, 1963) liegt der Prozentsatz sogar noch wesentlich höher. Man fand Tetraploidie, Triploidie, welche außer im Falle des Mosaiks niemals mit dem Leben zu vereinen sind, außerdem sämtliche denkbaren Trisomien, Turner-Konstitutionen usw. Bei Blasenmolen, bzw. bei abnormen Chorionzotten, fanden sich multiple Hypodiploidien (STOLTE et al., 1960) und XXY-Formationen (MAKINO, SASAKI und FUKUSHIMA, 1964; beide zit. nach LENZ, 1967). Bis jetzt ist noch wenig bekannt über den Effekt solcher Chromosomenkonstitutionen, ob die Aborte auf Grund letaler Läsionen des Embryos entstehen, oder ob die plazentaren Anomalien mit der regelrechten Ernährung von Embryo oder Decidua nicht vereinbar sind (SCHLEGEL et al., 1966).

Fällt eine geringere Fertilität oder sogar Infertilität auf, so läßt sich oft durch eine Chromosomenanalyse der betroffenen Frau oder ihres Partners Aufklärung schaffen. Abgesehen von den dabei immer wieder diagnostizierten Turner- und Klinefelter-Syndromen, ihren Varianten und Mosaiken, können wiederholte Aborte einen Hinweis auf eine balanzierte Translokation bei einem Partner geben. Diese balanzierten Translokationen wirken sich weder auf die Entwicklung noch auf den Phänotyp nachteilig aus, da ja das gesamte genetische Material, zwar umgestellt, aber vollständig vorhanden ist. Erkennen lassen sich diese reziproken Translokationen, gerade auch wenn ein Austausch gleich gro-

ßer Fragmente stattfand, am besten bei der Untersuchung meiotischer Chromosomen. An ein Translokationschromosom, das aus zwei Chromosomen hervorgegangen ist, lagern sich die beiden homologen Chromosomen in der Ausdehnung an, in welcher die gleiche Feinstruktur gegeben ist. So kommt es zu Tetravalenten, welche die beiden reziproken Translokationschromosomen verbinden. Der Befund eines normalen mitotischen Karyotyps besagt also nicht, daß nicht doch eine Chromosomenanomalie vorliegen kann.

Zur Auswirkung kommt diese Anomalie erst, wenn in der Meiose die entsprechenden Fragmente getrennt wurden, für die nun teils eine Monosomie, teils eine Trisomie besteht. So ergeben sich die sog. nicht balanzierten Translokationen, auf deren Grundlage unter anderem mongoloide Kinder auch bei jungen Müttern entstehen können (partieller Mongolismus durch D/G-Translokation). 18 Frauen und 11 Männer mit balanzierten Translokationen wurden untersucht (STALDER et al., 1965; zit. nach LENZ, 1967). Es ergaben sich unter den Kindern: 15 phänisch normale (Karyotyp nicht untersucht)
18 phänisch und karyotypisch normale
24 phänisch normale (mit Translokationen)
8 aneuploide
24 Aborte

Daneben kann aber auch durch ein zusätzliches, langes, akrozentrisches Chromosom oder auch nur durch ein überlanges, akrozentrisches Chromosom menstruelle Unregelmäßigkeiten auftreten, durch zentrische Fusion eine Oligospermie und zu 50% abnorme Spermien (LENZ, 1967).

Ein weiterer Fall von familiären Chomosomenaberrationen bei gleichzeitigem Auftreten eines hohen Autoantikörpertiters wird von ENGELBERTH et al. (1966) so verstanden, daß die Chromosomenaberrationen nicht die Ursache sondern die Folge dieser abnormen Antikörper in der affizierten Familie sind, und daß die Tendenz zu ihrer Bildung mit großer Wahrscheinlichkeit genetisch übertragen wird. Ob der

abnorme Karyotyp die Folge oder die Ursache der Autoimmunkrankheit (Colitis ulcerosa) darstellt, ist auch bei einem Fall mit einem XO/XisoX Mosaik zu überlegen (WILLIAMS et al., 1966).

Eine ähnliche Fragestellung ergibt sich bei den malignen Krankheiten. Zunächst wäre die Leukämie, besonders die chronisch myeloische Leukämie mit ihrem Ph^1-Chromosom zu nennen. Ein Beweis für die Krankheit als Folge der Chromosomenanomalie ist die Entdeckung eines Ph^1-Chromosoms, bevor im Blut der Beginn einer Leukämie festgestellt werden konnte (KEMP et al., 1963; zit. nach LEJEUNE, 1965). Bei malignen Tumoren, deren eigenartiger Karyotyp mit Polyploidie, Aneuploidie, Chromosomentranslokationen, Deletionen und Ringformen hinlänglich bekannt ist, sind die verschiedenen Theorien noch umstritten.

Noch weiß man nicht, ob ein Kausalzusammenhang zwischen strahleninduzierten Chromosomenaberrationen und etwaigen malignen, degenerativen Spätschäden besteht. Es steht zwar fest, daß ionisierende Strahlen Chromosomenanomalien hervorrufen und daß sie maligne Tumoren und Leukämien erzeugen können, aber es gibt noch keinen Beweis, daß die strahleninduzierte Leukämie kausal mit der Induktion eines Ph^1-Chromosoms verknüpft ist.

Bis jetzt lassen sich noch keine quantitativen Aussagen über die Abhängigkeit der Chromosomenaberrationen von der Art der Strahlenexposition und der Menge der absorbierten Strahlenenergie machen. Man kann nur allgemein feststellen, daß die Zahl der Aberrationen mit der Strahlendosis und der Größe des bestrahlten Körpervolumens zunimmt. Die Erkennung strahleninduzierter Chromosomendefekte ist wegen ihrer Mannigfaltigkeit recht schwierig (BAUCHINGER, 1967). Man kann nur sagen, daß sie mit der Zeit abnehmen, aber zum Teil sehr lange, sogar lebenslänglich, bestehen können.

Ähnlich liegt das Problem bei den Viren, die ebenfalls Chromosomenbrüche, "Pulveration" von Chromosomen, Zellfusio-

nen, Spindelabnormitäten (NICHOLS, 1966) und abnorme heterochromatische Regionen (GEDIKOĞLU, 1966) verursachen können.

Eine weitere Frage in dieser Richtung ist, wie weit schon das einfache Altern den Prozeß der malignen Entartung begünstigen kann. Eine Untersuchung von COURT BROWN et al. (1966) bestätigt in gewisser Weise diese Vermutung. Er findet eine bemerkenswerte Zunahme aneuploider Zellen bei den Frauen im Alter zwischen 55 und 65 Jahren und ein Anwachsen bis auf 13% mit 75 Jahren (als Vergleichswert: 5% mit 13 Jahren). Bei den Männern kann man diesen Anstieg erst jenseits von 65 Jahren beobachten. Es werden maximal nur 8% aneuploide Zellen gefunden. Dabei ist hauptsächlich das Y-Chromosom betroffen, sodaß man ein starkes Anwachsen der XO-Zellen beobachten kann. Bei der Frau fällt auf, daß mit dem Alter von 55 Jahren ebenfalls die Zellen mit 45 Chromosomen von 1,9% auf 6,6% zunehmen. Analysiert man genau, so fehlt in diesen Zellen ein mittelgroßes, submetazentrisches Chromosom, in anderen Zellen ist es zusätzlich vorhanden. Die Vermutung liegt nahe, daß der Alterungsprozeß bei den Frauen für die Teilungsirrtümer, die das eine X-Chromosom betreffen, verantwortlich ist. Damit wäre nahezu der Beweis für die Tatsache erbracht, daß mit dem Alter der Mutter die Gefahr mongoloider Kinder wächst.

Interessante Ergebnisse lieferte eine systematische Chromosomenanalyse von 189 Personen (JACOBS et al., 1964; zit. nach COURT BROWN et al., 1966), die wahllos aus den Patienten von drei praktischen Ärzten ausgewählt wurden. 0,5% dieser Gruppe wiesen strukturelle Neuordnungen der Autosomen, wie perizentrische Inversionen und reziproke Translokationen, auf. Die Häufigkeit aller Chromosomenanomalien betrug bei den Männern 5,8%, wobei 3,4% auf Autosomenanomalien und 2,4% auf Y-Anomalien entfielen. Bei den Frauen fand sich eine Autosomenanomalie in 1,7% der Fälle, Geschlechtschromosomenanomalien wurden nicht beobachtet.

Aus diesem kurzen Überblick läßt sich ersehen, welche Möglichkeiten für die Chromosomenanalyse im Rahmen der klinischen Diagnostik bestehen. Darüber hinaus ist auch bereits abzusehen, welche bedeutende Stellung die Zytogenetik in der Zukunft sicherlich einnehmen wird.

V ZUSAMMENFASSUNG

Wenn man bedenkt, daß es seit FLEMMING, d.h. von den ersten Anfängen der Zytogenetik fast 80 Jahre gedauert hat, bis sich die entsprechenden methodischen Verbesserungen durchsetzten und bis die entscheidenden Entdeckungen auf diesem Gebiet gemacht wurden, so empfindet man das als eine sehr lange Zeit. Wenn man sich aber klar macht, daß der Grund dafür gar nicht in den fehlenden technischen Errungenschaften lag, sondern allein in der mangelhaften Koordinierung und unvollständigen Kenntnis der verschiedenen Methoden, die von den einzelnen Forschern entwickelt wurden und bald wieder in Vergessenheit gerieten, so kann man nur hoffen und wünschen, daß in Zukunft gerade auf dem Gebiet der Zytogenetik die methodischen Fragen nicht nur als notwendiges Übel betrachtet werden.

Auch heute noch gibt es genügend Entwicklungsmöglichkeiten. Es müssen dringend Verbesserungen geschaffen werden, um die Chromosomenanalyse noch subtiler und objektiver durchführen zu können. Anders ist ein Fortschritt auf dem immer wichtiger werdenden Gebiet der Zytogenetik kaum denkbar. Von den Augen des Zytologen wird bereits das Äußerste verlangt - fast sind sie schon überfordert. Neue Markierungs-, Färbe- oder Präparationstechniken sollten zusätzlich gefunden werden, um vor allem für die klinische Diagnostik immer exaktere und detailliertere Angaben machen zu können. Mag dem Betroffenen selbst, etwa einem Kranken mit einem seltenen oder unklaren Syndrom, damit auch nicht viel geholfen sein, so kann er zumindest vor weiteren, eingreifenden und langwierigen diagnostischen Untersuchungen dadurch bewahrt werden.

Ein großes Feld eröffnet sich dem zytogenetisch orientierten Arzt in der Beratung von Familien, in denen eine Chromosomenanomalie beobachtet wurde und welche etwa durch ein mongoloides Kind belastet sind. Genauer als jemals zu-

vor kann durch Chromosomenstudien vorhergesagt werden, welches Risiko für die Geburt eines mißgebildeten Kindes besteht.

VI LITERATUR

ARAKAKI, D.T. and R.S. SPARKES: Mikrotechnique for culturing leukocytes from whole blood. Cytogenetics 2, 57-60(1963).

ARNOLD, J.: Beobachtungen über Kernteilungen in den Zellen der Geschwülste. Virchow's Archiv 78, 279-301 (1879).

ATKINS, L., P.D. TAFT, and K.P. DALAL: Asynchronous DNA synthesis of sex chromatin in human interphase nuclei. J. Cell Biol. 15, 390-393 (1962).

- J.A. BÖÖK, K.-H. GUSTAVSON, O. HANSSON, and M. HJELM: A case of XXXXY sex chromosome anomaly with autoradiographic studies. Cytogenetics 2, 208-232 (1963).

- and B. SANTESSON: The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human cells containing an isochromosome for the long arm of an X chromosome. Hereditas 51, 67-73 (1964).

- and B. SANTESSON: Chromosome DNA synthesis in cultured normal human female skin cells. Hereditas 55,39-46(1966).

BALEN, S., O.J. MILLER, and B.B. MUKHERJEE: Observations on chromosome duplication in cultured human leukocytes. Exp. Cell Res. 31, 100-112 (1963).

BAKER, L.E. and A.H. EBELING: Artificial maintenance media for cell and organ cultivation. I. The cultivation of fibroblasts in artificial and serumless media. J. Exp. Med. 69, 365-378 (1939).

BAKER, M.C. and N.B. ATKIN: Short term culture of lymphoid tissue for chromosome studies. Lancet I, 1164 (1963).

BAMFORD, S., G.W. MITCHELL, C. CASSIN, A. CORMAN, and B. FRENCH: Further observations on neutrophil appendages in sex chromosome aberrations. Acta cytol. 10, 323-330 (1966).

BARANETZKY (1880): zit. nach R. TURPIN et J. LEJEUNE: Les chromosomes humains. Paris: Gauthier-Villars 1965.

BARDELEBEN, von (1897): zit. nach FLEMMING, W.: Über die Chromosomenzahl beim Menschen. Anat. Anz. 14, 171-174 (1898).

BARNICOT, N.A. and H.E. HUXLEY: The electron microscopy of unsectioned human chromosomes. Ann. Hum. Genet. Lond. 25, 253-258 (1961).

BARR, M.L. and E.G. BERTRAM: A morphological distinction between neurones of the male and female and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature 163, 676-677 (1949).

- et al. (1953): zit. nach O.v. Verschuer: Genetik des Menschen. München-Berlin: Urban & Schwarzenberg 1959.

- and D.H. CARR: Correlations between sex chromatin and sex chromosomes. Acta cytol. 6, 34-41 (1962).

- and D.H. CARR: Nuclear sex. (1962) In: J.L. Hamerton: Chromosomes in medicine. 2nd print. Lond.: W. Heinemann (Medical books) Ltd. 1965.

- : Sex chromatin techniques. In: J.J. YUNIS: Human chromosome methodology. N.Y. and Lond.: Academic Press 1965.

BAUCHINGER, M.: Chromosomenaberrationen durch medizinische Strahlenanwendung. MMW 109, 1008-1014 (1967).

BAUGHAM, F.A. and B. HIRSCH: Karyotyping of cells from cerebrospinal fluid. Lancet II, 417 (1963).

BEERMANN, W.: Neue Wege der Chromosomenforschung. In: Bericht 7. Tagg. d. Dtsch. Ges. Anthropol. Tübingen 1961. Gött.-Berl.-Frankf.: Musterschmidt 1963.

BERGMAN, S.: Simple method for culture of cells on glass plates. Acta path. Microbiol. Scand. 47, 233 (1959).

BIESELE, J.J.: Experimental and therapeutic modification of mitosis. Cancer Res. 22, 779-787 (1962).

BIRDWELL, T.R., R.M. DINNETTE, F.H. SHELTON, and R.R. EGGEN: Leukocyte chromosome cultures by post. Lancet II, 291 (1965).

BISHOP, A. and O.N. BISHOP: Analysis of tritium-labelled human chromosomes and sex chromatin. Nature 199, 930-932 (1963).

BOOK, J.A., M. FRACCARO, and J. LINDSTEN: Cytogenetical observations in mongolism. Acta paediat. 48, 453-468 (1959).

- , B. SANTESSON, and P. ZETTERQUIST: Association between congenital heart malformation and chromosomal variations. Acta paediat. 50, 217-227 (1961).
- : Clinical cytogenetics. In: L. Gedda: De genetica medica, vol. III. Roma: Edizioni Istituto Mendel 1961.
BOTTURA, C. and I. FERRARI: A simplified method for the study of chromosomes in man. Nature 186, 904-905 (1960).
BRIDGES, C.B. (1914): zit. nach R. Turpin et J. Lejeune: Les chromosomes humains. Paris: Gauthier-Villars 1965.
- : Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. Genetics 1, 1-52, 107-163 (1916).
BROWN, R. (1831): zit. nach R. Turpin et J. Lejeune: Les chromosomes humains. Paris: Gauthier-Villars 1965.
BÜCHNER, P.T. et R.A. PFEIFFER: Quelques conclusions théoriques et pratiques de l'autoradiographie des chromosomes humains. Ann. Génét. 9, 90-93 (1966).
CARATZALI, A.: Sex appendages, arneth formula and menstrual cycle. Cytogenetics 2, 15-23 (1963).
CARR, D.H.: Chromosome studies in abortuses and stillborn infants. Lancet II, 603-606 (1963).
- : Chromosome studies in spontaneous abortions. Obstet. and Gynec. 26, 308-326 (1965). Ref. in Exc. Med., Hum. Gen. XXII, Vol.4 No.2.
CARREL, A.: Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue. J. Exp. Med. 17, 14 (1913).
CASPERSSON, T.: Studien über den Eiweißumsatz der Zelle. Naturwissenschaften 29, 33-43 (1941).
CHAUDHURI, A.: Chromosome analysis from whole blood. Ind. Jour. Med. Res. 54, 339-344 (1966).
CHRUSTSCHOFF, G.K. and E.A. BERLIN: Cytological investigations on cultures of normal human blood. J. Genet. 31, 243-261 (1935).
CHU, E.H.Y. and N.H. GILES: Human chromosome complements in normal somatic cells in culture. Amer. J. Hum. Gen. 11, 63-79 (1959).

- : The chromosome complements of human somatic cells. Amer. J. Hum. Gen. 12, 97-103 (1960).

CLARKE, C.M.: Techniques in the study of human chromosomes. (1962) In: J.L. Hamerton: Chromosomes in medicine. 2nd print. Lond.: W. Heinem. Ltd. 1965.

COLINGS, D.E.: H^3-uridine autoradiography of human chromosomes. Cytogenetics 5, 247-260 (1966).

CONGER, A.D. and L.M. FAIRCHILD: A quick-freeze method for making smear slides permanent. Stain technol. 28, 281-283 (1953).

CONNOLLY, J.M., K. BISHOP, CH.H. CARTER, and D.G. CARPENTER: Chromosome mini-cultures. Am. J. Clin. Pathol. 42, 434-436 (1964).

COURT BROWN, W.M., P.A. JACOBS, K.E. BUCKTON, and I.M. TOUGH: Chromosome studies on adults. London: Cambridge university press 1966.

DARLINGTON, C.D. and L.F. LA COUR: The handling of chromosomes. London: G. Allen & Unwin Ltd. 1962.

DAS, K.C., S. ABDULLAH, S. ROHATGI, and J. CHATTERJEE: A simplified method for the study of human chromosome by leukocyte culture form peripheral blood. Naturwissenschaften 52, 137-138 (1965).

DAVIDSON, W.M. and D.R. SMITH: A morphological sex difference in the polymorphnuclear neutrophil leukocytes. Brit. med. J. 2, 6-7 (1954).

- and D.R. SMITH: Human chromosomal abnormalities. London: Staples Press 1961.

- and SH. WINN: The relationship between the sex nodule and the chromosomes In: Davidson and Smith: Hum. chrom. abn. 1961. s.o.

DENVER REPORT: A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosoems. Ann. hum. Genet. Lond. 24, 319-325 (1960).

DOMOTRI, J.: Sexchromatinuntersuchung von Scheiden- und Mundschleimhautabstrichen mit dem Phasenkontrastmikroskop. Zbl. Gynäk. 86, 1119-1122 (1964).

DUESBERG, J.: Sur le nombre des chromosomes chez l'homme. Anat. Anz. 28, 475-479 (1960).

EAGLE, H.: Nutriton needs of mammlian cells in tissue culture. Science 122, 501-504 (1955).

EBERLE, P.: Die Chromosomenstruktur des Menschen in Mitosis und Meiosis. Stuttgart: G. Fischer 1966.

EDWARDS, J.H.: Painless skin biopsy. Lancet I, 496 (1960).

- and R.B. YOUNG: Chromosome analysis from small volumes of blood. Lancet II, 48-49 (1961).

- : Chromosome analysis from capillary blood. Cytogenetics 1, 90-96 (1962).

- : Chromosomal investigation by post. Lancet I, 725-726 (1963).

EGGEN, R.R.: Cytogenetics. Review of recent advances in a new field of clinical pathology. Am. J. clin. Pathol. 39, 3-37 (1963).

ENGELBERTH, O., J. CHARVÁT, Z. JEŽKOVA and J. RABOCH: Autoantibodies in chromatin-positive men. Lancet II, 1194 (1966).

EVANS, E.P., G. BRECKON, and C.E. FORD: An air-drying method for meiotic preparations from mammlian testes. Cytogenetics 3, 289-294 (1964).

- : A simple microtechnique for obtaining human chromosome preparations with some comments on DNA replication in sex chromosomes of the goat, cow, and pig. Exp. Cell Res. 38, 511-516 (1965).

EVANS, H.M. and O. SWEZY: A sex difference in chromosome lengths in mammlia. Genetics 13, 532-543 (1928).

FERGUSON-SMITH, M.A.: Cytogenetics in man. A.M.A. Arch. Int. Med. 105, 627-639 (1960).

- ,M.E. FERGUSON-SMITH, P.M. ELLIS, and M. DICKSON: The sites and relative frequencies of secondary constrictions in human somatic chromosomes. Cytogeneties 1, 325-343 (1962).

- : The techniques of human cytogenetics. Amer. J. Obstet. Gynec. 90/7II, 1035-1054 (1964).

FISCHER, A., T. ASTRUP, G. EHRENSRARD, and v.OEHLENSCHLAGER: Growth of animal tissue cells in artificial media. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 67, 40-46 (1948).

FLEMMING, W.: Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. Theil II. Arch. mikr. Anat. Entw. Mech. 18, 151-259 (1880).

- : Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. Theil III. Arch. mikr. Anat. Entw. Mech. 20, 1-86 (1882).

- : Über die Chromosomenzahl beim Menschen. Anat. Anz. 14, 171-174 (1898).

FOOT and STROBELL (1905): zit. nach R. Turpin et J. Lejeune: Les chromosomes humains. Paris: Gauthier-Villars 1965.

FORD, C.E. and J.L. HAMERTON: The chromosomes of man. Acta genet. 6, 264-266 (1956).

- and J.L. HAMERTON: The chromosomes of man. Nature 178, 1020-1023 (1956).

- and J.L. HAMERTON: A colchicin, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. Stain technol. 31, 247-251 (1956).

- , P.A. JACOBS, and L.G. LAJTHA: Human somatic chromosomes. Nature 181, 1565-1568 (1958).

- , K.W. JONES, P.E. POLANI, J.C. de ALMEIDA, and J.H. BRIGGS (1959): zit. nach R. Turpin et J. Lejeune: Les chromosomes humains. Paris: Gauthier-Villars 1965.

FRACCARO, M.: The cultivation of human somatic cells in vitro. In: W.M. Davidson and D.R. Smith : Human chromosomal abnormalities. London: Staples Press 1961.

FRØLAND, A.: A simplified method for making chromosome preparations from skin biopsies. Acta path. Microbiol. Scand. 53, 319 (1961).

- : A micromethod for chromosome analysis on peripheral bloodcultures. Lancet II, 1281-1282 (1962).

FUHRMANN, W.: Taschenbuch der allgemeinen und klinischen Humangenetik. Stuttgart: Wiss. Verl. Ges. m.b.H. 1965.

GAILLARD, J.L.J. and A. SCHABERG: A new spreading procedure for human chromosomes. Exp. Cell Res. 36, 415-417 (1964).

GARDNER, H.H. and H.H. PUNNETT: A improved squash technique for human male meiotic chromosomes: softening and concentration of cells; mounting in Hoyer's medium. Stain technol. 39, 245-248 (1964).

GAVAUDAN, P., N. GAVAUDAN et N. POMRIASKINSKY-KOBOZIEFF: Sur l'influence de la colchicine sur la caryocinèse dans les méristèmes radiculaires de l'Allium cepa. Compt. Rend. Seanc. Soc. Biol. 125, 705-708 (1937).

GEDIKOĞLU, A.G.: Heterochromatic human chromosomes. Lancet II, 1367 (1966).

GERMAN, J.: The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells. J. Cell Biol. 20/1, 37-55 (1964).

GEY, W.: Untersuchungen über die DNS-Replikationsmuster der Chromosomengruppen 4-5, 13-15 und 21-22 an in vitro gezüchteten menschlichen Lymphocyten. Humangenetik 2, 246-261 (1966).

GILBERT, C.W., S. MULDAL, L.G. LAJATHA, and J. ROWLEY: Time sequence of human chromosome duplication. Nature 195, 869-873 (1962).

- : A computer programme for the analysis of human chromosomes. Nature 212, 1437-1440 (1966).

- , L.G. LAJATHA, S. MULDAL, and C.H.OCKEY: Synchrony of chromosome duplication. Nature 209, 537-538 (1966).

GOTHE, H.D. and K. HINRICHSEN: Die Chromatinstruktur der Granulocytenkerne in ihrer Beziehung zu den geschlechtsspezifischen Kernanhangsgebilden. Klin. Wschr. 37, 506-511 (1959).

GROUCHY, J. de, M. ROUBIN et E. PASSAGE: Microtechnique pour l'étude des chromosomes humains a partir d'une culture de leukocytes sanguins. Ann. Génét. 7, 45 (1964).

GRUMBACH, M.M.: Human sexchromosome abnormalities in relation to DNA replication and heterochromatinization. Proc. nat. Acad. Sci. 49, 581-589 (1963).

GUARD, H.R.: A new technic for differential staining of the sex chromatin, and the determination of its incidence in exfoliated vaginal epithelial cells. Am. J. Clin. Pathol. 32, 145-151 (1959).

GUTHERZ, S.: Zur Kenntnis der Heterochromosomen. Arch. mikr. Anat. Entw. Mech. 69, 491-514 (1907).

HAMERTON, J.L.: Chromosomes in medicine (Little Club Clinics in Developmental Medicine No.5), 2nd. print. Lond.: Unit of the National Spastics Society. - W. Heinemann (Medical Books) Ltd. 1965.

HARPEL, K.E. and A. LEVAN: Breakage in human chromosomes induced by low temperature. Hereditas 51, 315-343 (1964).

HANSEMANN, D.: Über pathologische Mitosen. Virchow's Archiv 123, 356-370 (1891).

HANSEN-MELANDER, E., Y. MELANDER et KULLANDER (1956): zit. nach R. Turpin et J. Lejeune: Les chromosomes humains. Paris: Gauthier-Villars 1965.

HARNDEN, D.G.: A human skin culture technique used for cytological examination. Brit. J. Exp. Pathol. 41, 31-37 (1960).

- and S. BRUNTON: The skin culture technique. In: J.J. Yunis: Human chromosome methodology. N.Y. and Lond.: Academic Press 1965.

HEITZ, E.: Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren. Ber. Dtsch. bot. Ges. 47, 274-285 (1929).

- und H. BAUER (1933): zit. nach C.D. Darlington and L.F. LaCOUR: The handling of chromosomes. Lond.: Allen & Unwin Ltd. 1962.

- : Die Nukleal-Quetschmethode. Ber. Dtsch. bot. Ges. 53, 870-878 (1935).

HINRICHSEN, K. und J. KÖBBERLING: Die periphere Lage des Sexchromatins. Acta anat. 63, 559-570 (1966).

HSU, T.C.: Mammlian chromosomes in vitro. I. The karyotyp of man. J. Heredity 43, 167-172 (1952).

- and D.S. KELLOG: Primary cultivation and continous propagation in vitro of tissues from small biopsy specimens. J. nat. Cancer Inst. 25, 221-235 (1960).

HUGHES, A.: Some effects of abnormal tonicity on dividing cells in chick tissue cultures. Q. J. Micr. Sc. 93, 207-220 (1952).

HUNGERFORD, D.A., A.J. DONNELLY, P.C. NOWELL, and S. BECK: The chromosome constitution of human phenotypic intersex. Amer. J. Hum. Gen. 11, 215-236 (1959).

JACOBS, P.A. et J.A. STRONG (1959): zit. nach R. Turpin et J. Lejeune: Les chromosomes humains. Paris: Gauthier-Villars 1965.

KAJII, T., T. IMAI, T. HOMMA, and K. OIKAWA: Preparation of human chromosomes. Lancet I, 1323-1324 (1966).

KEMP, T. (1929): zit. nach R. Turpin et J. Lejeune: Les chromosomes humains. Paris: Gauthier-Villars 1965.

- : Über die somatischen Mitosen bei Menschen und warmblütigen Tieren unter normalen und pathologischen Verhältnissen. Zschr. Zellforsch. 11, 429- 444 (1930).

KIOSSOGLOU, K.A., W.J. MITUS, and W. DAMESHEK: A direct method for chromosome studies of human bon marrow. Am. J. Clin. Pathol. 41, 183-187 (1964).

KLINGER, H.P. and K.S. LUDWIG: A universal stain for the sex chromatin body. Stain technol. 32, 235- 244 (1957).

- and H.G. SCHWARZACHER: XY/XXY and sex chromatin positive cell distribution in a 60mm human fetus. Cytogenetics 1, 266-290 (1962).

KÖBBERLING, J.: Geschlechtsunterschiede im Kernchromatin neutrophiler Granulocyten. Humangenetik2, 207-218 (1966).

- : Die Häufigkeit von Drumsticks in Abhängigkeit von der Präparation der Zellen. Humangenetik 3, 104-112 (1966).

KODANI, M.: Three diploid chromosome numbers of man. Proc. Nat. Acad. Sci. 43, 285-292 (1957).

KOLLER, P.C.: The genetical and mechanical properties of sex chromosomes. Proc. Roy. Soc. Edin. 57, 194-214 (1937).

KOULISCHER, M.L.: Étude des chromosomes humains au contraste de phase. C.R. Acad. Sci. (Paris) 256, 3350-3351 (1963).

LECLERCQ, P.: Sur la variabilité d'action de la phytohémagglutinine en culture de sang périphérique. Nouv. Rev. Franc. Hémat. 6,209-214 (1966).

LEJEUNE, J., M. GAUTIER et R. TURPIN (1959): zit. nach R. Turpin et J. Lejeune: Les chromosomes humains. Paris: Gauthier-Villars 1965.

- et al. (1960): zit, nach R. Turpin et J. Lejeune s.o.

- Techniques. Leucémies et cancers. (1965) In: R. Turpin et J. Lejeune s.o.

LENZ, W.: Anomalien der Autosomen unter besonderer Berücksichtigung des Schwachsinns. In: P.E. Becker: Humangenetik. Ein kurzes Handbuch in 5 Bänden. Vol.V/2. Stuttg.: G. Thieme 1967.

LEVAN, A. and G. ÖSTERGEN: The mechanism of c-mitotic action. Hereditas 29, 381-443 (1943).

LEWIS, M.R.: Reversible solation of the mitotic spindle of living chick embryo cells studied in vitro. Arch. exp. Zellforsch. 16,159-166 (1934).

LIMA-DE-FARIA, A., J. REITALU, and S. BERGMAN: The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of man. Hereditas 47, 695-704 (1961).

LINDAHL-KIESSLING, K., B. WERNER, and J.A. BÖÖK: Short term cultivation of human thoracic duct lymphocytes with Phaseolus vulgaris extract. Hereditas 53, 40-46 (1965).

LONDON REPORT: The London conference on the normal human karyotype. Cytogenetics 2, 264-268 (1963).

LYON, M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus). Nature 190, 37 (1961).

- :Genetic factors on the X-chromosome. Lancet II, 434 (1961).

- : Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. Am. J. Hum. Genet. 14, 135-148 (1962).

MacKINNEY, A.A., F. STOHLMAN, and G. BRECHER: The kinetics of cell proliferation in cultures of human peripheral blood. Blood 19, 349-358 (1962).

MAKINO, S. and M. SASAKI: On the chromosome number of man. Proc. Japan. Acad. 35, 99-104 (1959).

McILREE, M.E., W.S. TULLOCK, and J.E.NEWSAM: Studies on human meiotic chromosomes from testicular tissue. Lancet I, 679-682 (1966).

McKEE, M.E., S.E. HARRIS, and H. KIHARA: Chromosomal alteration with low temperature perseveration of tissue fragments for cultures. Proc. soc. exp. biol. med. 123, 499-502 (1966).

MELLMAN, W.J., H.D. KLEVIT, and P.S. MOORHEAD: Studies on phytohemagglutin-stimulated leukocyte cultures. Blood 20, 103-104 (1962).

- : Human peripheral blood leukocyte cultures. In: J.J. Yunis: Human chromosome methodology. N.Y. and Lond.: Academic Press 1965.

MENDELSOHN, M.L., T.J. CONWAY, D.A. HUNGERFORD, W.A. KOLMAN, B.H. PERRY, and J.M.S. PREWITT: Computer-oriented analysis of human chromosomes. I. Photometric estimation of DNA content. Cytogenetics 5, 223-242 (1966).

MILLER, O.J., B.B. MUKHERJEE, S. BADER, and A.C. CHRISTAKOS: Autoradiographic studies of X-chromosome duplication in an XO/X-isochromosomeX mosaic human female. Nature 200, 918-919 (1963).

MITTWOCH, U.: Relationship of Barr bodies, nuclear size and desoxyribonucleic acid value in cultured human cells. Nature 205, 477-479 (1965).

MOORE, K.L. and M.L. BARR: Nuclear morphology, according to sex in human tissues. Acta Anat. 21, 197-208 (1954).

- and M.L. BARR (1955): zit. nach O. v.Verschuer: Genetik des Menschen. München-Berl.: Urban & Schwarzenberg 1959.

MOORHEAD, P.S., P.C. NOWELL, W.J. MELLMAN, D.M. BATTIPS, and D.A. HUNGERFORD: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res. 20, 613-616 (1960).

- and V. DEFFENDI: Asynchrony of DNA synthesis in chromosomes of human diploid cells. J. Cell Biol. 16, 202-208 (1963).

MORGAN, J.F., H.J. MORTON, and R.C. PARKER: Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on synthetic medium. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 73, 1-8 (1950).

MORISHIMA, A., M.M. GRUMBACH, and J.H. TAYLOR: Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin. Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 756-763 (1962).

MURO, L.A.: The utilization of phase contrast microscopy preparations for sex chromatin determinations. Acta cytol. 10, 233-236 (1966).

MURTHY, L.S.N. and E. v.HAAM: The occurence of the sex chromatin in white blood cells of young adults. Am. J. clin. Pathol. 30, 216-223 (1958).

NICHOLS, W.W.: The role of viruses in the etiology of chromosomal abnormalities. Amer. J. Hum. Genet. 18, 81-92 (1966).

NOWELL, P.C.: Phythemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 20, 462-466 (1960).

OHNO, S., W.D. KAPLAN, and R. KINOSITA: X-chromosome behaviour in germ and somatic cells of Rattus norvegicus. Exp. Cell Res. 22, 535-544 (1961).

- , S. MARINO, W.D. KAPLAN, and R. KINOSITA: Female germ cells of man. Exp. Cell Res. 24, 106-110 (1961).

- : Direct handling of germ cells. In: J.J. Yunis: Human chromosome methodology. N.Y. and Lond.: Academic Press 1965.

OSGOOD, E.E. and J.H. BROOKE: Continous tissue culture of leukocytes from human leukemic bloods by application of gradient principles. Blood 10, 1010-1022 (1955).

OSTERGEN, G.: Colchicine mitosis, chromosome contraction, narcosis and protein chain folding. Hereditas 30, 429-467 (1944).

PAINTER, T.S.: The Y-chromosome in mammls. Science 53, 503-504 (1921).

- : Studies in mammlian spermatogenesis. II. The spermatogenesis of man. J. Exp. Zool. 37, 291-334 (1923).

- : A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting chromosome maps. Science 78, 585-586 (1933).

- (1934): zit. nach R. Turpin et J. Lejeune: Les chromosomes humains. Paris: Gauthier-Villars 1965.

PANSEGRAU, D.G. and R.E. PETERSON: Improved staining of sex chromatin. Am. J. clin. Pathol. 41, 266-272 (1964).

PARK, W.W.: The occurence of sex chromatin in early human and macaque embryos. J. Anat. 91, 369-373 (1957).

PATAU, K.: The identification of individual chromosomes especially in man. Amer. J. Hum. Genet. 12, 250-276 (1960).

- : Identification of chromosomes. In: J.J. Yunis: Human chromosome methodology. N.Y. and Lond.: Academic Press 1965.

POWSNER, E.R.: Frequency of endoreduplication in short-term cultures of human blood cells. J. Lab. Clin. Med. 67, 610- 614 (1966). Ref. in Exc. Med. XXII, Hum. Gen. Vol. 4, No. 10

PUCK, T.T., S.J. CIECIURA, and A. ROBINSON: Genetics of somatic mammlian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. J. Exp. Med. 108, 945-956 (1958).

ROBBINS, E. and P.I. MARCUS: Mitotically synchronized mammalian cells: A simple method for obtaining large populations. Science 144, 1152-1153 (1964).

ROTHFELS, K.H. and L. SIMINOVITCH: An air drying technique for flattening chromosomes in mammlian cells grown in vitro. Stain technol. 33, 73- 77 (1958).

RUNGE, W.J.: Bright field, phase contrast, and fluorescence microscopy. In: J.J. Yunis: Human chromosome methodology. N.Y. and Lond.: Academic Press 1965.

SACHS, L.: Sex-linkage and the sex chromosomes in man. Annals of Eugenics 18, 255 (1954).

SAKSELA, E. and P.S. MOORHEAD: Enhancement of secondary constrictions and the heterochromatic X in human cells. Cytogenetics 1, 225-244 (1962).

SANDBERG, A.A., G.F. KOEPF, L.H. CROSSWHITE, and T.S. [illegible] HAUSCHKA: The chromosome constitution of human marrow in various developmental and blood disorders. Amer. J. Hum. Genet. 12, 231-249 (1960).

SANSONE, G., A. RASORE-QUARTINO, and G. VENEZIANO: Two red-cell populations in the human heterozygous for G-6-P.D. deficiency. Lancet I, 329 (1964).

SASAKI, M.: Observations on the modification in size and shape of chromosomes due to technical procedure. Chromosoma 11, 514-522 (1961).

- and S. MAKINO: The demonstration of secondary constrictions in human chromosomes by means of a new technique. Am. J. Hum. Genet. 15, 24-33 (1963).

SCHADE, H.: Genom- und Chromosomenmutationen beim Menschen. In: Ber. 7. Tagg. d. Dtsch. Ges. Anthropol., Tübingen 1961. Göttingen-Berlin-Frankf.: Musterschmidt 1963.

SCHLEGEL, R.J., R.L. NEU, J. CARNEIRO LEAO, E. FARIAS, M.J. ASPILLAGA, and L.I. GARDNER: Observations on the chromosomal, cytological and anatomical characteristics of 75 human conceptuses. Cytogenetics 5, 430-446 (1966).

SCHMID, W.: DNA replication patterns of human chromosomes. Cytogenetics 2, 175-193 (1963).

- : Autoradiography of human chromosomes. In: J.J. Yunis: Human chromosome methodology. N.Y. and Lond.: Acad. Press 1965.

SCHNEDL, W.: Untersuchungen über das Sexchromatin in menschlichen Fibroblastenkulturen. Acta anat. 57, 52-65 (1964).

SCHWARZACHER, H.G. and W. SCHNEDL: Endoreplication in human fibroblast cultures. Cytogenetics 4, 1-18 (1965).

SHETTY, K.T., N.L. SHARMA, and K.M. WAHAL: Sex chromatin in prednisone-treated children. Brit. med. J. 2, 84-86 (1966).

SIEBER, H.: Nachweis von Barr'schen Chromatinkörperchen in Blut- und Knochenmarkkulturen mit Hilfe von radioaktivem Thymidin. Klin. Wschr. 42, 820 (1964).

SLIFER, E.H.: Insect development. VI. The behavior of grasshopper embryos in anisotonic balanced salt solutions. J. Exp. Zool. 67, 137-157 (1934).

SLIZYNSKI, B.M.: Pachytene analysis of snell's T (5:8) translocation in the mouse. J. Genet. 50, 507-511 (1952).

SMITH, D.W., P.M. MARDEN, M.J. McDONALD, and M. SPECKHARD: Lower incidence of sex chromatin in buccal smears of newborn females. Pediatrics 30, 707-711 (1962).

STAHL, A., M. HARTUNG et M. LEBEUF: Anomalies spontanées de la mitose et leur répercussion sur le nombre de chromosomes dans des cultures de fibroblastes humains. C. R. Séanc. Soc. Biol. 158, 128-131 (1964).

STERN, C.: Zytologisch-genetische Untersuchungen als Beweise für die Morgansche Theorie des Faktorenaustauschs. Biol. Zbl. 51, 547-587 (1931), zit. nach Beermann.

TANAKA, Y., L.B. EPSTEIN, G. BRECHER, and F. STOHLMAN: Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood. Blood22, 614-629 (1963).

TAYLOR, A.I.: Sex chromatin in the newborn. Lancet I, 912-914 (1963).

TAYLOR, E.W.: The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. I. Kinetics of inhibition and binding of H^3-colchicine. J. Cell Biol. 25, 145-160 (1965).

TAYLOR, J.H., P.S. WOODS, and W.L. HUGHES: The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. Proc. Nat. Acad. Sci. 43, 122-128 (1957).

TJIO, J.H. and A. LEVAN: The chromosome number of man. Hereditas 42, 1-6 (1956).

- and T.T. PUCK: Genetics of somatic mammlian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. J. Exp. Med. 108, 259-268 (1958).

- and T.T. PUCK: The somatic chromosomes of man. Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 1229-1237 (1958).

- and J. WHANG: Direct chromosome preparation of bone marrow cells. In: J.J. Yunis: Human chromosome methodology. N.Y. and Lond.: Acad. Press 1965.

WEGMANN, T.G. and D.W. SMITH: Lower incidence of sex chromatin in newborn females delivered by cesarean section. Pediatrics 34, 419-421 (1964).

WENDT, G.G. und B.E. WOLF: Die Chromosomenzahl beim Menschen. Dtsch. Med. Wschr. 82, 1832- 1836 (1957).

WILCOX, E.V.: Human spermatogenesis. Anat. Anz. 17, 316-318 (1900).

WILLIAMS, E.D., E. ENGEL, P.D. TAFT, and A.P. FORBES: Gonadal dysgenesis and ulcerative colitis. A case report with clinical, cytogenetic, and post mortem studies. J. Med. Genet. 3, 51-55 (1966).

WILSON, E.B.: The sex chromosomes. Arch. mikr. Anat. Entw. Mech. 77, 249-271 (1911).

WINIWARTER, H. de: Études sur la spermatogenèse humaine. Arch. de Biol. 27, 91-189 (1912).

- et K. OGUMA: Nouvelles recherches sur la spermatogenèse humaine. Arch. de Biol. 36, 99-166 (1926).

WOLSTENHOLME, D.R.: Electron microscopic identification of sex chromatin bodies of tissue culture cells. Chromosoma 16, 453-462 (1965).

YUNIS, J.J.: Human chromosome methodology. N.Y. and London: Acad. Press 1965.

Herrn Professor Dr. W.F. Haberlandt möchte ich sehr herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und ganz besonders für die ausgezeichnete Anleitung und Hilfe in allen Fragen danken. Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Dr. W. Gieseler, dessen Institut so gute und ungestörte Arbeitsbedingungen bot.

Lebenslauf

Am 22.11.1942 wurde ich, Susanne Mayer-List, als Tochter des verstorbenen Professor Dr. med. Richard Mayer-List und seiner Frau Eva, geb. Wagner, in Stuttgart geboren. Dort besuchte ich bis 1962 die Schule und legte am 28.2.1962 am Hölderlingymnasium in Stuttgart das Abitur ab.

Im folgenden Jahr arbeitete ich als Haustochter im Gästehaus und Pflegeheim der Kaiserswerther Diakonissen in Rom.

Im Frühjahr 1963 begann ich mit dem Medizinstudium in Tübingen. Es folgte das Vorphysikum im Frühjahr 1964 und das Physikum im Herbst 1965.

Nach jeweils einem klinischen Semester in München und in Wien kehrte ich im Herbst 1966 nach Tübingen zurück und schloß dort nach weiteren vier Semestern am 20.2.1969 mein klinisches Studium mit dem Staatsexamen ab.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 19 a
Telefon 291063